

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 СТАБНИКОВ

“ 01 ” грудня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГЛУЩЕНКО Анна Владиславівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез глюкозооксидази *Aspergillus niger*

керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович ст. викл.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 листопада 2025 року № 957-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 30.01.2026

3. Вихідні дані до роботи Цільовий продукт біосинтезу – глюкозооксидаза. Біологічний агент - *Aspergillus niger* NRC9. Об'єм ферментера для виробництва глюкозооксидази – 2 м³, коефіцієнт заповнення складає - 0,6

Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ

1. Характеристика глюкозооксидази. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу глюкозооксидази. РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення глюкозооксидази. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу глюкозооксидази на 1 аркуші формату А1

Апаратурна схема біосинтезу глюкозооксидази на 1 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика глюкозооксидази	01.12.2025 – 05.12.2025	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	06.12.2025 – 11.12.2025	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	12.12.2025 – 14.12.2025	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу глюкозооксидази	15.12.2025 – 18.12.2025	
5	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	19.12.2025 – 20.12.2025	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу глюкозооксидази	21.12.2025 – 23.12.2025	
7	РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення глюкозооксидази	24.12.2025 – 28.12.2025	
8	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	29.12.2025 – 30.12.2025	
9	Вступ, реферат, список використаної літератури	02.01.2026 – 03.01.2026	
10	Оформлення списку літературних джерел	04.01.2026 – 05.01.2026	
11	Оформлення вступу та реферату	06.01.2026 – 08.01.2026	
12	Оформлення презентації	09.01.2026 – 11.01.2026	
13	Оформлення пояснювальної записки	12.01.2026 – 15.01.2026	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Анна ГЛУЩЕНКО
(ім'я та прізвище)

Віктор УДИМОВИЧ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу глюкозооксидази з активністю (170 Од/мл). Глюкозооксидаза (ГО) використовується в багатьох галузях промисловості завдяки своїй здатності окислювати глюкозу та виробляти перекис водню. Його швидка плинність та висока стабільність знаходять широке застосування в фармацевтичній та медичній промисловості. Для багатьох із цих застосувань ГО використовується в біосенсорах або наносенсорах для покриття тест-смужок для визначення рівня глюкози в крові. Розрахована потужність виробництва становить 2 336 379 600 Од (19,18 м³ культуральної рідини) глюкозооксидази.

Технологічна схема біосинтезу глюкозооксидази включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 2 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання глюкозооксидази передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, восьми розділів, списку використаних джерел, технологічної схеми (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А1, 2 аркуші). Загальний обсяг роботи – 68 сторінок, 11 таблиць.

Ключові слова: ферменти, глюкозооксидаза, цукровий діабет, *Aspergillus niger* NRC9, мікробний біосинтез.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and instrumental schemes for the biosynthesis of glucose oxidase with an activity of (170 U/ml). Glucose oxidase (GO) is used in many industries due to its ability to oxidize glucose and produce hydrogen peroxide. Its fast flowability and high stability are widely used in the pharmaceutical and medical industries. For many of these applications, GO is used in biosensors or nanosensors to coat test strips for determining

blood glucose levels. The estimated production capacity is 2,336,379,600 U (19.18 m³ of culture fluid) of glucose oxidase.

The technological scheme of glucose oxidase biosynthesis includes auxiliary work (preparation of aeration air, preparation of titrating agents, sterilization of nutrient media) and the technological process (three stages of growing seed material and biosynthesis in a fermenter with a volume of 2 m³ with a filling factor of 0.6). The technology of obtaining glucose oxidase involves the use of a single-stage cultivation scheme by a deep periodic method.

The qualification work consists of an introduction, eight sections, a list of sources used, a technological scheme (format A1, 1 sheet) and an apparatus scheme (format A1, 2 sheets). The total volume of the work is 68 pages, 11 tables.

Keywords: enzymes, glucose oxidase, diabetes mellitus, *Aspergillus niger* NRC9, microbial biosynthesis.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ	10
1.1. Структурні особливості глюकोзооксидази	10
1.2. Сфери застосування глюकोзооксидази	11
1.2.1. Використання глюकोзооксидази в харчовій промисловості	12
1.2.2. Використання глюकोзооксидази у фармацевтичній галузі	13
1.2.3. Використання глюकोзооксидази у медицині.....	14
1.2.4. Використання глюकोзооксидази у текстильній промисловості.....	15
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	17
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	17
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	23
3.1. Розрахунок потреби в глюкозооксидазі	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва глюкозооксидази.....	24
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	26
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу глюкозооксидази <i>Aspergillus niger</i> NRC9.....	26
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ	28
4.1. Вибір умов і способу культивування <i>Aspergillus niger</i> NRC9.....	28
4.2. Вибір типу ферментера.....	29
4.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	30
4.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>Aspergillus niger</i> NRC9 - продуцента глюкозооксидази	31
4.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	35
4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівних апаратах.....	36
4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	38
4.5. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу глюкозооксидази	39
4.6. Обґрунтування вибору піногасника.....	40
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	43
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	47
РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ	55
7.1. Обґрунтування етапу виділення глюкозооксидази	55
7.1.1. Виділення біомаси з культуральної рідини після здійснення біосинтезу.....	55
7.1.2. Обґрунтування етапу екстракції глюкозооксидази	56
7.2. Обґрунтування етапу очищення глюкозооксидази	57
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	59
8.1 Мікробіологічний контроль.....	59

8.1.1 Висів на агаризовані поживні середовища	59
8.1.2 Мікроскопіювання	61
8.2 Технологічний контроль.....	62
8.2.1 Визначення концентрації біомаси <i>Aspergillus niger</i> NRC9	62
8.2.2 Визначення активності глюкозооксидази	62
8.2.3 Визначення концентрації джерела Карбону (глюкоза) у середовищі.....	62
8.2.4 Визначення концентрації джерела Нітрогену (сульфат амонію) у середовищі...	63
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	64

ВСТУП

Мікробні ферменти відіграють ключову роль у розвитку промислових біотехнологій. Їх сучасне застосування охоплює широкий спектр галузей, зокрема целюлозно-паперову, шкіряно-взуттєву, текстильну, хімічну, фармацевтичну, харчову промисловість і виробництво напоїв, а також мийні засоби, біопаливо, корми для тварин і засоби особистої гігієни. На сьогодні існує значна потреба у створенні нових, більш ефективних і універсальних ферментів для розробки сталих та економічно доцільних біопроектів. Для пошуку нових ферментів активно використовуються мікробне різноманіття та сучасні молекулярні підходи, такі як метагеноміка та геноміка. Каталітичні властивості отриманих ферментів можуть бути покращені або модифіковані за допомогою стратегій раціонального, напівраціонального чи спрямованого еволюційного дизайну. Більшість промислових ферментів, що використовуються сьогодні, є рекомбінантними білками, які продукуються мікроорганізмами — бактеріями або мікроскопічними грибами [1].

Серед різноманіття мікроорганізмів, гриби вважаються особливо перспективними продуцентами ферментів. Вони мають здатність ефективно синтезувати широкий спектр ферментів, зокрема протеази, амілази, ліпази та оксидоредуктази, які активно застосовуються в харчовій, хімічній та фармацевтичній промисловості. Виробництво грибкових ферментів зазвичай здійснюється шляхом зануреної, твердофазної або поверхневої ферментації. Крім того, використання іммобілізованих грибкових клітин у біотехнологічних процесах дозволяє покращити стабільність та повторне використання біокаталізаторів, що підвищує економічну ефективність виробництва [2].

Одним із важливих грибкових ферментів є глюкозооксидаза (ГО) — фермент з широким спектром застосувань: від харчової промисловості до медицини та біосенсорики. Глюкозооксидаза каталізує окиснення β -D-глюкози

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Глуценко А.В.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							8	2
<i>Керівник</i>		<i>Удимович В.М.</i>				<i>Кафедра БТМ</i> 8		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

до глюконової кислоти з утворенням перекису водню, що надає їй антимікробних властивостей і робить її корисною, зокрема, у виробництві пакувальних матеріалів та діагностичних систем. Найпоширенішим продуцентом ГО є гриб *Aspergillus niger*, який характеризується високою ферментативною активністю та придатністю до промислового культивування [3].

Актуальність. У зв'язку з постійним зростанням попиту на ГО, особливо в галузях діагностики, моніторингу рівня глюкози та виробництва біопалива, актуальним є розроблення ефективних та масштабованих технологій її біосинтезу й очищення саме на основі грибкових систем.

Новизна цього дослідження полягає у використанні штаму *Aspergillus niger* NRC9, здатного продукувати глюкозооксидазу з високою активністю (170 Од/мл) на економічному поживному середовищі, собівартість якого становить лише 5,15 грн/л. Це дозволяє досягти умовної вартості одиниці ферменту на рівні 0,03 грн/Од.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ

1.1. Структурні особливості глюкозооксидази

Глюкозооксидаза (ГО) (β -d-глюкозо:кисень-1-оксидоредуктаза; ЕС 1.1.2.3.4) каталізує окислення β -d-глюкози до глюконової кислоти, використовуючи молекулярний кисень як акцептор електронів з одночасним утворенням перекису водню [4]. Як перекис водню, так і D-глюконолактон розщеплюються спонтанно та каталітично. Незважаючи на це, ферментативна активність ГО знижується, коли перекис водню накопичується та інактивує фермент; продукт розпаду D-глюконолактону, глюконова кислота, накопичується, знижуючи рН розчину [5].

Таблиця 1.1

Властивості глюкозооксидази з *A. niger* [5]

Властивості	Значення
Молекулярна маса	150–186 кДа
Поглинання УФ-ВІД	280: 380: 450 (нм)
Питома активність (рН 5,6, 25–37°C)	11,5: 1: 1,03 (співвідношення)
K_m (константа Міхаеліса відносно глюкози)	80–172 мкмоль глюкози/хв/мг ферменту 198–248 мМ (рН 5–7, 20–30°C, кисень) 110–120 мМ (рН 5,6, 0–38°C, кисень) 50–74 мМ (рН 5,5, 15–30°C, кисень) 33 мМ (рН 5,6, 25°C, кисень) 41,8 мМ (рН 6,86, 25°C)
Діапазон температур	20–50°C
Діапазон рН	4–7
Інгібітори	Іони Ag^+ , Hg^{2+} та Cu^{2+} , Арсеніт, п-хлормеркурибензоат, фенімеркурацетат та інші
Ізоелектрична точка (pI)	4,2

НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Глуценко А.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						10	7
Керівник		Удимович В.М.			Кафедра БТМ 10		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 1.
ХАРАКТЕРИСТИКА
ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ

Глюкозооксидазу вперше відкрив Мюллер у 1928 році в екстрактах *Aspergillus niger*. Структурно, як показано на рис. 1.1, глюкозооксидаза являє собою гомодимер, що складається з двох ідентичних субодиниць по 80 кДа та двох нековалентно зв'язаних флавінаденіндинуклеотидів (ФАД). Кофермент ФАД діє як переносник електронів під час каталізу. Найпоширеніша форма ферменту походить з *A. niger*, містить близько 20 мас.% аміноцукрів та близько 16–19 мас.% вуглеводів, з яких 80 мас.% – це N- або O-глікозидно зв'язані молекули манози [5].

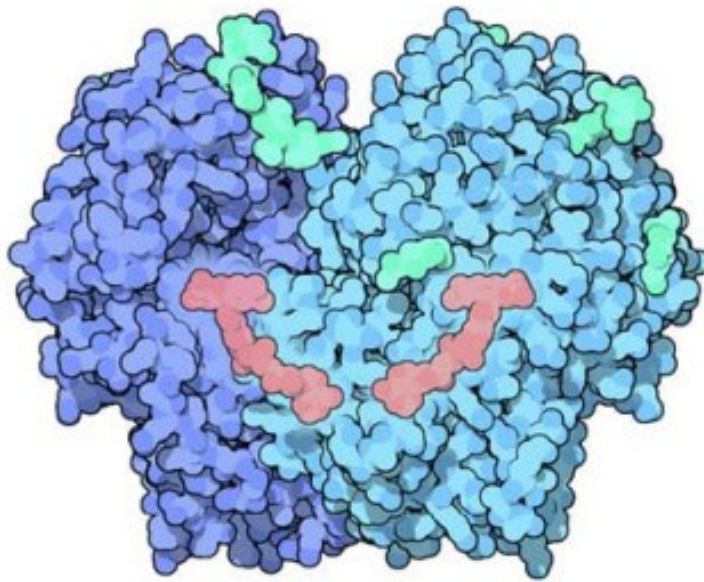


Рис.1.1. Глюкозооксидаза, дві її субодиниці (темно- та світло-сині) та кофермент ФАД (рожевий)

1.2. Сфери застосування глюкозооксидази

ГО використовується в багатьох галузях промисловості завдяки своїй здатності окислювати глюкозу та виробляти перекис водню. Його швидка плинність та висока стабільність знаходять широке застосування в харчовій, фармацевтичній, медичній, текстильній та енергетичній промисловості. Для багатьох із цих застосувань ГО використовується в біосенсорах або наносенсорах, у наночастинках або в нанолистах [6].

У багатьох сучасних застосуваннях ГО часто використовується в поєднанні з іншими ферментами, наприклад, тирозиназою, при аналізі та

розрізненні сусла та вина, α -амілази та ксиланази для покращення якості тіста та хліба, пероксидаза для точного вимірювання рівня глюкози в крові та слині і сльозах, інгібітор аутофагії хлорохін у інтервенційній терапії раку та інсулін для регулювання рівня глюкози в крові при діабеті. Нарешті, його було поєднано з протираковим препаратом тирапазаміном та людським сироватковим альбуміном для створення нанореактора, здатного підвищувати рівень гіпоксії та активних форм кисню, а також пригнічувати ріст пухлини [6].

1.2.1. Використання глюкозооксидази в харчовій промисловості

ГО має кілька важливих застосувань у харчовій промисловості, включаючи хлібопекарську промисловість, виробництво напоїв, виробництво глюконової кислоти та консервування харчових продуктів. У хлібопекарській промисловості ГО використовується як окислювач для покращення якості хлібобулочних виробів. Перекис водню, що утворюється під дією ГО, робить тісто більш еластичним і в'язким, а ліпаза та ГО можуть підвищити якість і довговічність хліба [6].

ГО також знаходить застосування для зниження вмісту алкоголю у вині. Вищі температури протягом вегетаційного періоду, ймовірно, підвищують рівень глюкози у винограді. Знижуючи рівень глюкози, яка в іншому випадку перетворилася б на спирт шляхом анаеробного бродіння, ГО може зменшити кількість алкоголю в отриманому вині. Перекис водню, що утворюється ГО, має бактерицидну дію на агресивні кислотні та молочні мікроби, що утворюються під час процесу бродіння. Утворений перекис водню може бути видалений ферментом каталазою, який перетворює H_2O_2 на кисень і воду. ГО у поєднанні з каталазою зменшує кількість спирту краще, ніж ГО окремо, перетворюючи глюкозу на глюконову кислоту [6].

Для вимірювання кількості глюкози в рідинах ГО також був включений до складу аналітичних пристроїв, відомих як біосенсиори. Ці пристрої поєднують біологічний компонент, часто якийсь фермент або антитіло, з фізичним або

електричним перетворювачем та електричним компонентом для вимірювання аналіту, що цікавить [6].

Видаляючи кисень і глюкозу з їжі, ГО можна використовувати для подовження терміну придатності з двох причин. По-перше, під час консервування їжі може відбуватися небажана реакція між нуцеофільними функціональними групами амінокислот з активними карбонільними групами цукрів, що призводить до неферментативного потемніння через реакцію Майяра. Видалення небажаних цукрів з їжі, що підлягає консервуванню, запобігає цьому потемнінню [6].

Глюкозооксидаза також використовується безпосередньо як антимікробний засіб у харчовій промисловості. Було продемонстровано, що він зменшує ріст багатьох патогенних бактерій, включаючи *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus* та *Listeria monocytogenes*. Вчені виявили, що іммобілізована ГО пригнічує ріст *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis* [6].

1.2.2. Використання глюкозооксидази у фармацевтичній галузі

Глюкозооксидаза також має кілька медичних та фармацевтичних застосувань. В останні роки доставка глюкозочутливих препаратів на основі ГО стала більш помітною. Іммобілізовані глюкозочутливі платформи в основному використовуються в контрольованій модуляції саморегульованої доставки ліків. Самоорганізуючі плівки, полімерні везикули, зшиті мікрогелі, певні наночастинки кремнезему та мікропристрої, виготовлені з резервуарів інсуліну в глюкозочутливих системах доставки інсуліну, класифікуються як основні платформи на основі ГО. Виробництво глюконової кислоти та відповідних солей є одним з найважливіших результатів реакції, каталізованої ГО. У фармацевтичній промисловості солі глюконової кислоти натрію, кальцію, цинку та заліза використовуються для синтезу деяких відомих препаратів, таких як глюконодельта-лактонові глюконати Na, Ca або Fe з різними фармацевтичними застосуваннями. Наприклад, глюконати кальцію використовуються для

лікування дефіциту, пов'язаного з Ca. З іншого боку, глюконати цинку корисні для правильного загоєння ран та лікування застуди, затримки статевого дозрівання (особливо коли це пов'язано з дефіцитом Zn), вразливості до інфекцій, деяких психічних дефектів та шкірних висипань. Генерація глюконової кислоти залежить від кількох факторів, включаючи тип субстрату, тиск кисню, температуру та стабільність ГО. Згідно з останніми даними, ферментативне зшивання з модифікованою глюкозою робить фармацевтичні системи більш стабільними та біологічно активними, а також збільшує максимальний вихід (до 85%). Крім того, вчені оцінили вплив відповідних гідродинамічних характеристик на кінетичні параметри для досягнення кращого ГО-залежного виробництва глюконової кислоти [7].

1.2.3. Використання глюкозооксидази у медицині

Глюкозооксидаза широко використовується в різних галузях медицини завдяки своїй високій специфічності до глюкози та здатності каталізувати її окиснення з утворенням водню пероксиду.

Глюкозооксидазу можна використовувати як антимікробний засіб у засобах для догляду за порожниною рота. Бактерії, що викликають стоматологічні захворювання, добре відомі. Існують певні мікроорганізми, такі як *Streptococcus mutans* та *S. sobrinus*, які можуть спричинити карієс зубів. На сьогоднішній день використовується кілька стратегій для послаблення потенціалу цих патогенів. Однією з них було покращення пероксидазної системи як частини вродженого слинного імунітету шляхом використання комбінації ГО, лактопероксидази та йодиду (або тіоціанату). Фермент оксидази може бути швидко інактивований активністю протеолітичних ферментів, які у великій кількості містяться в ротовій порожнині. Фактично, це H_2O_2 , який діє як потужний бактерицид. Порівняно з грамнегативними бактеріями, грампозитивні бактерії, такі як *S. rattus* та *S. mutans*, є більш стійкими видами. Здатність ГО знищувати *S. mutans* може бути посилена шляхом використання

ферментативного синтезу, пов'язаного з важкими ланцюгами імуноглобулінів [7].

Здатність ГО споживати внутрішньоклітинну глюкозу та кисень для вироблення перекису водню та глюконової кислоти може дозволити його використання в певних комбінаціях для терапії раку. Споживаючи глюкозу, ГО може зменшувати доступні джерела метаболічної енергії ракових клітин, тим самим пригнічуючи їх проліферацію, а споживаючи кисень та виробляючи глюконову кислоту, може збільшувати гіпоксію та кислотність мікрооточення пухлини [6].

Станом на сьогодні ГО широко використовується в найпоширеніших методах вимірювання рівня глюкози в крові. Науковці досліджували ефективність вимірювання рівня глюкози за допомогою флуоресцентних датчиків та ГО під час інтенсивних фізичних навантажень, коли очікується вищий рівень споживання кисню, та за звичайної щоденної активності. Вони виявили, що обидва методи були менш точними під час фізичних навантажень, ніж під час щоденної активності, і цей висновок зберігався у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій глюкози [6].

Нещодавно також було розроблено недорогий неінвазивний паперовий біосенсор для вимірювання глюкози зі сліз. Нарешті, щоб усунути деякі обмеження та помилки в деяких з найбільш поширених систем моніторингу, вчені розробили біосенсор, що складається з магнетиту, лігніну та полідофаміну, зв'язаних з ГО, разом з фероценом та спеціалізованим вуглецевим пастовим електродом. Результати показали, що цей біосенсор має потенціал для застосування у визначенні глюкози в різних комерційних продуктах [6].

1.2.4. Використання глюкозооксидази у текстильній промисловості

Хоча текстильне виробництво є давньою людською діяльністю, воно й сьогодні потребує вдосконалення. Процеси попередньої обробки целюлозних тканин включають шліхтування, очищення гідроксидом натрію та відбілювання перекисом водню в сильних лужних умовах (рН 10,0–11,0) та за температури

вище 90 °C. Ці процеси забруднюють навколишнє середовище, є небезпечними для здоров'я людини, пошкоджують целюлозні волокна та вимагають високого споживання енергії, води та хімікатів. У цьому контексті використання глюкозооксидази зростає завдяки її здатності перетворювати кисень та глюкозу на H_2O_2 та глюконову кислоту. Дійсно, контрольоване утворення H_2O_2 *in situ* є рушійною силою, що спонукає використовувати ГО у текстильному виробництві. Крім того, ГО може бути захищений циклодекстринами від деактивації, спричиненої аніонними поверхнево-активними речовинами, що додаються до процесу як антипінні, диспергуючі та змочувальні агенти [8].

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Глюкозооксидаза була очищена з низки різних грибкових джерел, головним чином з роду *Aspergillus* та *Penicillium* [5]. Більшість комерційно виробленої глюкозооксидази було виділено з міцелію *Aspergillus niger*, вирощеного головним чином для виробництва глюконової кислоти або її солей, таких як глюконат натрію або глюконат кальцію. Відповідно, фермент був отриманий по суті як побічний продукт або супутній продукт виробництва глюконату [9].

У таблиці 2.1 наведено дані щодо біосинтезу глюкозооксидази трьома різними штамами *Aspergillus niger* (A247, NRC9 та E45). Для кожного штаму зазначено склад поживного середовища, що включає джерело вуглецю (глюкоза в концентрації від 60 до 100 г/л), джерела азоту (пептон або $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), а також мінеральні компоненти, зокрема KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та CaCO_3 , який часто використовується як регулятор рН та джерело кальцію.

Тривалість культивування становила 72 або 96 годин, залежно від штаму та умов поживного середовища. Наприкінці процесу визначалась ферментативна активність отриманого продукту, яка вказується в одиницях на мілілітр культуральної рідини (Од/мл). Зібрані дані свідчать про індивідуальні особливості кожного штаму та вплив складу середовища на здатність продукувати глюкозооксидазу.

					НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Глуценко А.В.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							17	6
Керівник		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.						17		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Таблиця 2.1

Особливості одержання глюкооксидази продуцентом *Aspergillus niger*

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Активність ферменту, Од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Aspergillus niger</i> A247	Глюкоза – 60; пептон - 3; (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 0,4; KH ₂ PO ₄ - 0,188; MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,156; CaCO ₃ - 35.	72	145,22	Колби інкубували у струшуючому інкубаторі при 30°C і 200 об/хв, рН 7,2.	Haq, I. U., Nawaz, A., Mukhtar, H., & Ahmed, W. Isolation and identification of glucose oxidase hyper producing strain of <i>Aspergillus niger</i> . <i>British Microbiology Research Journal</i> . 2014, 4(2): 195 [10].
<i>Aspergillus niger</i> NRC9	Глюкоза - 100; CaCO ₃ - 25; (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 1,8; MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,4.	96	170	Занурену ферментацію проводили в колбах Ерленмейєра об'ємом 250 мл, що містили 50 мл середовища, засівали одним диском (1,1 × 10 ⁶ спор/диск) як інокулят та інкубували при 30 °C при струшуванні 200 об/хв, рН 5,5.	Farid, M.A., Ghoneimy, E.A., El-Khawaga, M.A. et al. Statistical optimization of glucose oxidase production from <i>Aspergillus niger</i> NRC9 under submerged fermentation using response surface methodology. <i>Ann Microbiol.</i> 2013, 63: 523–531. doi: https://doi.org/10.1007/s13213-012-0497-5 [11]
<i>Aspergillus niger</i> E45	Глюкоза – 80; пептон – 3; (NH ₄) ₂ HPO ₄ -0,388; KH ₂ PO ₄ - 0,188; MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,156; CaCO ₃ – 35.	72	69,47	Інокульовані колби поміщали в струшувальний інкубатор при 250 об/хв, температурі 30°C, рН 5-5,8.	Haq, I. U., Nawaz, A., Mukhtar, H., Mansoor, Z., Riaz, M., Ahmed, M., & Ameer, S. M. Random mutagenesis of <i>Aspergillus niger</i> and process optimization for enhanced production of glucose oxidase. <i>Pak. J. Bot.</i> 2014, 46(3): 1109-1114 [12].

При порівнянні трьох штамів *Aspergillus niger*, бачимо, що тривалість культивування не завжди прямо впливає на активність ферменту. Штам *Aspergillus niger* A247 має тривалість культивування 72 години та активність 145,22 Од/мл. Штам *Aspergillus niger* NRC9 культивується довше — 96 годин, але має найвищу активність ферменту — 170 Од/мл. Штам *Aspergillus niger* E45 також культивується 72 години, проте його активність значно нижча — 69,47 Од/мл.

Також слід враховувати вартість поживних середовищ (табл. 2.2), оскільки їх склад може впливати на загальні витрати. Тому важливо порівнювати не тільки активність ферменту, а й економічну ефективність використання кожного штаму.

Таблиця 2.2

**Вартість поживних середовищ для культивування *Aspergillus niger*
для одержання глюкозооксидази**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації *
<i>Aspergillus niger</i> A247	Глюкоза	60	39	2,34	1
	пептон	3	1300	3,9	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,4	30	0,012	3
	KH ₂ PO ₄	0,188	48	0,009	4
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,156	18,6	0,003	5
	CaCO ₃	35	47,7	1,67	6
Вартість 1 л поживного середовища – 7,93 грн					
<i>Aspergillus niger</i> NRC9	Глюкоза	100	39	3,9	1
	CaCO ₃	25	47,7	1,19	6
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,8	30	0,054	3
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	18,6	0,007	5
Вартість 1 л поживного середовища – 5,15 грн					
<i>Aspergillus niger</i> E45	Глюкоза	80	39	3,12	1
	пептон	3	1300	3,9	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,388	30	0,011	3
	KH ₂ PO ₄	0,188	48	0,009	4
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,156	18,6	0,003	5
	CaCO ₃	35	47,7	1,67	6
Вартість 1 л поживного середовища – 8,71 грн					

Примітка. * - Ціни наведені станом на травень 2025 р. 1 - <https://soda.kiev.ua/ua/p92855184-glyukoza-pishevaya.html>; 2 - <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>; 3 - <https://soda.kiev.ua/ua/p30020835-diammonijfosfat-1000-rossiya.html>; 4 - <https://kreon-d.com.ua/ua/p1069040022-monokalijfosfat.html> ; 5 -

https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu?srsltid=AfmBOor66BbfxWGARBGBc_auQ_2IN9WO3IscIfv2LbmGvmZUfCYgW10r ; 6
[- https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj?srsltid=AfmBOooGDYOeyrLtJvQTg19bK7xBEBoLsaVySCTDrzFNu9nH5KYgWls4](https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj?srsltid=AfmBOooGDYOeyrLtJvQTg19bK7xBEBoLsaVySCTDrzFNu9nH5KYgWls4)

При порівнянні вартості поживних середовищ для трьох штамів *Aspergillus niger* видно, що найбільш економічним є штам *Aspergillus niger* NRC9, у якого вартість поживного середовища становить 5,15 грн/л. Це свідчить про його економічну вигідність порівняно з іншими штамми. Штам *Aspergillus niger* A247 має вартість поживного середовища 7,93 грн/л, що є вищим, ніж у NRC9, але нижчим, ніж у E45. Штам *Aspergillus niger* E45 має найвищу вартість поживного середовища — 8,71 грн/л, що робить його найменш економічно вигідним серед трьох. Однак, крім вартості поживних середовищ, важливо порівняти умовні витрати на одиницю активності ферменту (табл. 2.3) для кожного штаму. Це дозволить оцінити, скільки коштує отримання кожної одиниці ферменту, що є ключовим фактором для вибору найбільш економічно ефективного штаму у виробничих процесах.

Таблиця 2.3

Умовна вартість одиниці активності глюкозооксидази

Біологічний агент	Активність ГО, од/мл	Тривалість культивування, год	Кількість одиниць активності ГО за годину, од/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість одиниці активності ГО, грн/од
<i>Aspergillus niger</i> A247	145,22	72	2,02	7,93	0,05
<i>Aspergillus niger</i> NRC9	170	96	1,77	5,15	0,03
<i>Aspergillus niger</i> E45	69,47	72	0,96	8,71	0,12

На основі аналізу показників для трьох штамів *Aspergillus niger*, можна зробити висновок, що найефективнішим варіантом для виробництва глюкозооксидази є штам *Aspergillus niger* NRC9. Хоча цей штам має тривалість

культивування 96 годин, що є довшим порівняно з іншими штамми, його висока активність ферменту (170 Од/мл) і низька вартість поживного середовища (5,15 грн/л) роблять його економічно вигідним. Крім того, умовна вартість одиниці активності ферменту для *Aspergillus niger* NRC9 є найнижчою серед усіх варіантів — 0,03 грн/од, що робить його найбільш ефективним з точки зору витрат на одиницю активності глюкозооксидази. У порівнянні з іншими штамми, *Aspergillus niger* NRC9 пропонує оптимальне співвідношення між ціною, активністю та тривалістю культивування, що робить його найкращим вибором для біотехнологічного виробництва.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування *A. niger* NRC9 для одержання 170 Од/мл глюкозооксидази становить 96 год.

Розрахунок концентрації біомаси

Оскільки фактична кількість біомаси продуцента *A. niger* NRC9 в статті [11] не вказана дослідниками, розрахунок її теоретичного виходу проводиться на основі загального вмісту азоту в поживному середовищі. Такий підхід дозволяє оцінити потенційну продуктивність системи, виходячи з того, що в середньому клітини мікроорганізмів містять близько 10 % азоту у складі своєї сухої маси.

Джерелами азоту в середовищі є як неорганічна сполука — дигідроортофосфат амонію $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$.

Молярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ становить 132,06 г/моль, а маса азоту в ньому: $14 \times 2 = 28$ г/моль. Для визначення кількості азоту в 1,8 г дигідроортофосфату амонію використано пропорцію: $X = 28 \times 1,8 / 132,06 = 0,38$ г азоту.

Враховуючи, що мікробна біомаса зазвичай містить близько 10 % азоту, можна визначити теоретично можливий вихід біомаси: $0,38/0,1 = 3,8$ г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 3,8 г біомаси становить $3,8 \times 0,5 = 1,9$ г. Враховуючи, що для

синтезу біомаси потрібна енергія, приблизно 40% вуглецю піде на «холосте» окислення, отже вміст вуглецю дорівнюватиме $1,9 \times 40\% + 1,9 = 2,66$ г Карбону.

Молярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) становить 180,156 г/моль, а маса вуглецю в ній становить 72 г. Отже в 100 г глюкози міститься: $100 \times 72 / 180,156 = 39,96$ г вуглецю, що повністю задовольняє потреби для синтезу біомаси.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 3,8 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $3,8 \times 0,03 = 0,114$ г/л. Джерелом Фосфору в поживному середовищі є дигідроортофосфату амонію ($(NH_4)_2HPO_4$).

У 132,06 г $(NH_4)_2HPO_4$ міститься 31 г фосфору, а 0,114 г фосфору міститься у X г солі. $X = (132,06 \times 0,114) / 31 = 0,48$ г. У статті [11] зазначено, що вміст дигідроортофосфату амонію у середовищі становить 1,8 г/л, що є достатнім для синтезу біомаси.

Ось склад поживного середовища, що буде використовуватись у подальшій частині курсової роботи:

- Глюкоза - 100;
- $CaCO_3$ - 25;
- $(NH_4)_2HPO_4$ - 1,8;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,4.

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Розрахунок потреби в глюкозооксидазі

Діабет, також відомий як цукровий діабет (ЦД), став критичною глобальною проблемою громадського здоров'я, характеризується порушенням метаболізму глюкози, що може призвести до серйозних ускладнень у різних системах органів. У пацієнтів з діабетом спостерігається високий рівень цукру в крові через дефіцит інсуліну та резистентність або порушення секреції інсуліну. За оцінками, у світі живе приблизно 422 мільйони людей з діабетом, який спричиняє 1,5 мільйона смертей щороку, а поширеність і кількість випадків діабету швидко зростають у всьому світі [13].

Самоконтроль рівня глюкози в крові є корисним інструментом у лікуванні цукрового діабету. Пацієнти з діабетом часто вимірюють рівень глюкози в крові, щоб виявити гіпоглікемію та скоригувати дозу інсуліну за потреби [14]. Результати досліджень показують, що якісний глікемічний контроль значно знижує такі діабетичні ускладнення, як діабетичний кетоацидоз, макро- та мікросудинні діабетичні ускладнення [15]. Завдяки таким рекомендаціям щодо підтримки нормального рівня глюкози в крові було розроблено серію відповідних пристроїв для вимірювання рівня глюкози [16].

Зазвичай вимірювання рівня глюкози базуються на взаємодії з одним із трьох ферментів: гексокіназою, глюкозооксидазою або глюкозо-1-дегідрогеназою. Глюкозооксидаза є стандартним ферментом для біосенсорів; вона має відносно вищу селективність до глюкози. Основна концепція глюкозного біосенсора базується на тому, що іммобілізована глюкозооксидаза каталізує окислення β -D-глюкози молекулярним киснем, утворюючи глюконову кислоту та перекис водню [16].

					НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Глуценко А.В.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							23	5
Керівник		Удимович В.М.				23		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

З огляду на наведені дані та те, що глюкозооксидаза використовується для покриття тест-смужок у біосенсорах для визначення рівня глюкози в крові, потребу в глюкозооксидазі ми будемо розраховувати на основі кількості тест-смужок, необхідних для самоконтролю рівня цукру у пацієнтів із діабетом.

Згідно з даними Міжнародної діабетичної федерації (Diabetes Atlas), у 2021 році в Україні було зареєстровано 2000325 осіб із діабетом [17]. Протокол лікування цукрового діабету передбачає самоконтроль рівня глюкози в крові щонайменше чотири рази на день [15]. Таким чином, річна потреба в тест-смужках на одну людину становить:

$$4 \times 365 \text{ днів} = 1460 \text{ тест-смужок.}$$

Враховуючи загальну кількість пацієнтів, загальна річна потреба в тест-смужках в Україні становить:

$$1460 \times 2000325 = 2920474500 \text{ смужок.}$$

Знаючи річну кількість тест-смужок для самоконтролю рівня глюкози в крові в Україні, необхідно розрахувати відповідну потребу в глюкозооксидазі. Згідно з патентними даними, для виготовлення тест-смужок на них наносять приблизно 1 мкл розчину глюкозооксидази, концентрація якого коливається в межах 1500–8000 одиниць активності на мілілітр (Од/мл) [18]. Це забезпечує близько 8 одиниць ферменту на одну тест-смужку, що формує основу для подальших розрахунків. Прийемо, що одна смужка містить 8 Од глюкозооксидази, тоді річна потреба у ферменті становитиме:

$$2920474500 \times 8 \text{ Од} = 23\,363\,796\,000 \text{ Од}$$

3.2. Розрахунок потужності виробництва глюкозооксидази

На ринку України доступні як вітчизняні, так і імпорتنі постачальники глюкозооксидази, що пропонують фермент у різних формах для застосування в харчовій, фармацевтичній та біотехнологічній промисловості.

Серед українських виробників глюкозооксидази особливе місце займає компанія ENZIM Biotech, що розташована в місті Ладижин Вінницької області, яка пропонує фермент з активністю 5000 одиниць на мілілітр (Од/мл) [19]. Окрім

вітчизняних виробників, на ринку присутні й імпортні постачальники. Так, компанія Selitra постачає глюкозооксидазу E1102, яка широко використовується в хлібопекарській промисловості для покращення структури тіста [20].

Враховуючи наявність як вітчизняних, так і імпортних постачальників глюкозооксидази на українському ринку, наше виробництво здатне задовольнити близько 10% загальної річної потреби у ферменті. Такий обсяг враховує існуючу конкуренцію та дозволяє поступово виходити на ринок, забезпечуючи стабільні поставки для сегменту, що ще не охоплений існуючими виробниками.

Отже потужність нашого виробництва глюкозооксидази на рік становитиме:

$$23\,363\,796\,000 \text{ Од} \times 10\% = 2\,336\,379\,600 \text{ Од}$$

Для забезпечення річної потреби в глюкозооксидазі (Од) на рік необхідно розрахувати об'єм культуральної рідини, який дозволить отримати таку кількість ферменту. Відомо, що продуцент *Aspergillus niger* NRC9 продукує глюкозооксидазу з активністю 170 Од/мл (170 000 Од/л) [11]. Отже, дізнаємось скільки літрів культуральної рідини необхідно для отримання 2 336 379 600 Од глюкозооксидази:

$$V_{\text{кр}} = 2\,336\,379\,600 / 170\,000 = 13\,743 \text{ л або } 13,7 \text{ м}^3$$

Під час виділенні ферменту з культуральної рідини відсоток втрат становить 40 %.

У цьому разі необхідно отримати таку кількість культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$):

$$13,7 \text{ м}^3 - 60 \%$$

$$V_{\text{кр}} - 100\%$$

$$V_{\text{кр}} = (13,7 \times 100) / 60 = 19,18 \text{ м}^3$$

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

Для забезпечення річної потреби у глюкозооксидазі (згідно п.3.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) $19,18 \text{ м}^3$ культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів ($T_{\text{тр}}$) – 80, тоді об'єм культуральної рідини за добу ($V_{\text{д}}$) становить:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{тр}} = 19,18 / 80 = 0,24 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 0,24 \times 104,5) / 24 = 1,15 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу ($T_{\text{к}} = 96$ год) та час підготовки ферментера до роботи ($T_{\text{пр}} = 8,5$ год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера ($T_{\text{пр}}$) включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Визначивши об'єм культуральної рідини за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_s , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{цк}} / K_s = 1,15 / 0,6 = 1,91 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{\text{гф}} = 2 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу глюкозооксидази *Aspergillus niger* NRC9

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері об'ємом 2 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Робочий об'єм ферментера ($V_{\text{роб}}$) визначають за формулою:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{г.ф}} \times K_{\text{зап}},$$

де: $V_{\text{г.ф}}$ – геометричний об'єм ферментера; $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення, 0,6.

$$V_{\text{роб}} = 2 \times 0,6 = 1,2 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 1,2 м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 1,2 \times 0,1 = 0,12 \text{ м}^3 \text{ (120 л) посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування грибів у посівному апараті об'ємом 200 л.

Для одержання 0,12 м³ культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.2}} = 0,12 \times 0,1 = 0,012 \text{ м}^3 \text{ (12 л) посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного (12 л) можна одержати у процесі вирощування *A. niger* NRC9 у стандартному інокуляторі об'ємом 20 л.

12 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 12 \times 0,1 = 1,2 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного одержують культивуванням *A. niger* NRC9 у 8 колбах на качалці об'ємом 750 мл по 150 мл поживного середовища.

Кількість стадій та об'єми підготовки посівного матеріалу наведено в табл. 3.1:

Таблиця 3.1.

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

Об'єм ферментера, м ³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м ³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м ³	Конденсат (10%), м ³	Об'єм підготовки поживного середовища, м ³ (л)
2	0,6	1,2	0,12 (120 л)	0,12 (120 л)	0,96
0,2 (200 л)	0,6	0,12 (120 л)	0,012 (12 л)	0,012 (12 л)	0,096 (96 л)
0,02 (20 л)	0,6	0,0012 (12 л)	0,0012 (1,2 л)	-*	0,00108 (10,8 л)

Примітка* - конденсат не враховано, оскільки стерилізація композицій поживного середовища відбуватиметься в колбах в автоклаві

РОЗДІЛ 4
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
БІОСИНТЕЗУ

4.1. Вибір умов і способу культивування *Aspergillus niger* NRC9

Для культивування *Aspergillus niger* NRC9 доцільно використовувати аеробні умови, оскільки цей мікроорганізм є аеробом та потребує кисню для росту та синтезу глюкозооксидази. Процес культивування має відбуватися в умовах активного аераційного струшування при 200 об/хв, що забезпечує належне насичення середовища киснем та ефективний обмін речовин в клітинах гриба [11].

Оскільки *Aspergillus niger* є мезофілом і росте при температурі 30°C, що є типовим для багатьох мікроорганізмів, що використовуються в біотехнологічних процесах, а також при рН 5,5 [11], яке є кислим, цей мікроорганізм може бути чутливим до контамінації сторонніми мікроорганізмами. У таких умовах, де оптимальні умови для росту *Aspergillus niger* можуть співпадати з умовами для розвитку інших мікроорганізмів, застосування асептичних умов під час культивування є необхідним для запобігання забрудненню культурального середовища та збереження якості кінцевого продукту, особливо при тривалому культивуванні. Тому для забезпечення високої ефективності процесу та чистоти продукту, обираємо асептичні умови культивування.

Глибинне культивування дозволяє ефективно аерувати середовище, що важливо для ферменту, який потребує кисню для своєї активності. Крім того, у рідкому середовищі легше контролювати температуру, рН та концентрацію поживних речовин, що критично для високої продуктивності. Періодичний режим, на відміну від безперервного, простіший у реалізації, дешевший і менш схильний до контамінації, оскільки всі компоненти вносять на початку, а культуральну рідину збирають лише після завершення процесу. Також цикл

					НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Глуценко А.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						28	15
Керівник		Удимович В.М.			Кафедра БТМ 28		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ					РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ		
ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ							
СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ					СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ		

виробництва глюкозооксидази займає лише кілька діб, що добре узгоджується з періодичним підходом, тоді як безперервне культивування для цього грибного виду має технологічні труднощі через особливості його росту та спороношення [21].

Отже, культивування *Aspergillus niger* NRC9 здійснюється періодично глибинним способом в аеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу.

4.2. Вибір типу ферментера

Для культивування *Aspergillus niger* NRC9 доцільно вибрати ферментер, який дозволяє підтримувати аеробні умови з інтенсивною аерацією та перемішуванням, оскільки цей мікроорганізм є аеробом і потребує постійного доступу кисню для росту та ефективного синтезу глюкозооксидази. Ферментер має бути оснащений ерліфтним перемішуючим пристроєм, щоб забезпечити рівномірний розподіл кисню, поживних речовин і тепла в усьому об'ємі середовища, а також запобігати локальному накопиченню метаболітів чи утворенню зон з недостатньою аерацією.

Оскільки *Aspergillus niger* росте при температурі 30 °C і рН 5,5, важливо, щоб ферментер мав точну систему контролю температури й рН, що дозволяє підтримувати оптимальні умови протягом усього процесу. Крім того, через схильність грибів до утворення спор і чутливість середовища до контамінації, обов'язковою є наявність асептичної конструкції ферментера: він має бути герметичним, з можливістю стерилізації на місці (SIP) та стерилізації всіх подач (інокулят, повітря, середовище).

Таким чином, оптимальним вибором є асептичний аеробний ферментер періодичної дії з ерліфтним перемішуючим пристроєм, системами аерації, контролю температури та рН, який дозволяє підтримувати стабільні умови культивування для максимального виробництва глюкозооксидази.

4.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Для культивування *Aspergillus niger* NRC9 використовують аеробні умови, оскільки цей мікроорганізм є аеробом та потребує кисню для росту та синтезу глюкозооксидази. Процес культивування має відбуватися в умовах активного аераційного струшування при 200 об/хв, що забезпечує належне насичення середовища киснем та ефективний обмін речовин в клітинах гриба. Отже, в технологічній схемі необхідно передбачити стадії підготовки аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря здійснюється поетапно:

1. Забір повітря. Атмосферне повітря надходить через вертикальну трубу з повітрязабірником, розташованим на 2–3 м вище найвищої точки будівлі, що зменшує ризик потрапляння пилу, часток ґрунту та органічних домішок.

2. Грубе очищення. Повітря проходить через тканинні фільтри, де видаляються частинки пилу розміром понад 50 мкм. Для цієї стадії зазвичай використовують поліестер, поліпропілен або скловолоконні тканини, які мають високу механічну міцність, стійкі до вологи та не втрачають фільтраційної здатності при стисканні повітря. Такі матеріали добре затримують великі частинки, але не створюють надмірного опору потоку.

3. Стиснення. Очищене повітря подається в компресори або турбоповітродувки, де стискається; температура при цьому підвищується до 120–200 °С.

4. Охолодження і осушення. Стиснене повітря охолоджують до температури «точки роси», що сприяє конденсації вологи. У ресивері видаляють конденсат, залишки мастила та вирівнюють пульсації потоку.

5. Стабілізація параметрів. Для підтримання сталих умов повітря підігрівають у теплообмінниках до 45–50 °С.

6. Тонке очищення. Остаточне очищення здійснюють у дві стадії:

— головні фільтри, ступінь очищення 95%, встановлені біля ферментаційних відділень;

— індивідуальні фільтри стерильності 99,99%, розташовані безпосередньо перед ферментерами.

Для цих етапів застосовують фільтрувальні елементи з активованого вугілля, полімерних мембран (PTFE, PES), або мікрОВОЛОКОН (скловолокло, целюлоза).

7. Додаткова стерилізація. У лабораторіях і боксах, де працюють із посівним матеріалом, повітря додатково знезаражують УФ-опроміненням для зниження мікробного навантаження у приміщеннях [22].

4.4. Обґрунтування способу підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування *Aspergillus niger* NRC9 - продуцента глюкозооксидази

Для виробничого біосинтезу глюкозооксидази продуцентом *Aspergillus niger* NRC9 використовуємо поживне середовище наступного складу:

- Глюкоза - 100;
- CaCO_3 - 25;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 1,8;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4.

Виробниче культивування *A. niger* NRC9 проводитиметься в ферментері об'ємом 2 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Попередньо в три етапи здійснюватиметься підготовка посівного матеріалу в колбах на качалці та у посівних апаратах об'ємами 20 та 200 л.

При аналізі поживного середовища для культивування *A. niger* NRC9 бачимо, що до його складу входять компоненти, які потребують попередньої підготовки: глюкоза та кальцій карбонат.

Глюкозу вносять в поживне середовище у вигляді 40%-го розчину, оскільки компоненти середовища, зокрема вуглеводи, є вразливими до мікробної контамінації. Для початку потрібно розрахувати вміст глюкози в поживному середовищі для різних стадій вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.

Отже, для приготування 40%-го розчину глюкози потрібно розрахувати необхідну кількість води.

Для стадії вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках:

40 г глюкози – 60 г води

120 г глюкози – X

$$X = 120 \times 60 / 40 = 180 \text{ г води}$$

Для стадії вирощування посівного в інокуляторі на 20 л:

400 г глюкози – 600 г води

1200 г глюкози – X

$$X = 1200 \times 60 / 40 = 1800 \text{ г води}$$

Для стадії вирощування посівного в інокуляторі на 200 л:

4 кг глюкози – 6 кг води

12 кг глюкози – X

$$X = 12 \times 6 / 4 = 18 \text{ кг води}$$

Для стадії виробничого біосинтезу в ферментері на 2 м³:

40 кг глюкози – 60 кг води

120 кг глюкози – X

$$X = 120 \times 6 / 4 = 180 \text{ кг води.}$$

Кальцій карбонат (CaCO_3) практично не розчиняється у воді, тому його не розчиняють, а суспендують — тобто рівномірно розмішують у воді перед додаванням до середовища або перед стерилізацією. Для приготування стабільної суспензії зазвичай використовують співвідношення: 1 частина CaCO_3 : 5 частин води за масою. Дані розрахунку та особливості приготування кальцію карбонату наведені у табл. 4.1

Також до складу поживного середовища входять фосфатні солі та солі магнію, які не допускається стерилізувати разом через ризик утворення осаду. У зв'язку з цим у технологічній схемі необхідно передбачити підкислення відповідних розчинів до рН 4,0–4,5 за допомогою 6%-го розчину соляної кислоти, що здійснюється безпосередньо в інокуляторах і ферментері.

Оскільки оптимальне значення рН для росту *A. niger* NRC9 підтримується на рівні 5,5, після підкислення та змішування компонентів поживного середовища необхідно також передбачити можливість регулювання рН за допомогою 6%-го розчину натрій гідроксиду (NaOH), який використовують для підлужнення в разі потреби. Дані розрахунку та особливості приготування титрувальних агентів наведені у табл. 4.1.

Таблиця 2.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	Глюкоза (40%)		CaCO ₃		HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, г (кг)	Особливість приготування	Вміст, г (кг)	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
1,2	120 г	у колбі 750 мл	30 г	у колбі 500 мл	-	-	-	-
12	1200 г	у реакторі 5 л	300 г	у реакторі- змішувачі 5 л	24	у колбі на 500 мл	24	у колбі на 500 мл
120	12 кг	у реакторі 50 л	3 кг	у реакторі- змішувачі 50 л	240		240	
1200	120 кг	у реакторі 500 л	30 кг	у реакторі- змішувачі 500 л	2400	у реакторі на 5 л	2400	у реакторі на 5 л

Нижче наведено особливості приготування і стерилізації середовища для вирощування інокуляту (3 стадії) і виробничого біосинтезу.

4.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Після аналізу складу поживного середовища для вирощування інокуляту, компоненти доцільно умовно згрупувати у композиції залежно від режиму їх стерилізації:

Композиція А: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: (NH₄)₂HPO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: MgSO₄×7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Глюкоза (композиція А) є термолабільною сполукою, тому її стерилізують у щадному режимі, аби запобігти розкладанню. Карбонат кальцію виділено в окрему композицію (композиція Б), оскільки цей компонент завжди стерилізується окремо від інших складників середовища та потребує попереднього суспендування у воді. Гідрофосфат амонію (композиція В) стерилізують окремо від сульфату магнію (композиція Г), щоб уникнути утворення малорозчинних або нерозчинних сполук у процесі нагрівання. Композиції Б–Г стерилізуються при стандартному температурному режимі, прийнятому для солей. Усі чотири композиції стерилізують в автоклаві відповідно до встановлених умов для кожного типу компонентів.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 4.2:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1200 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	100	120	А	300
Вода		180 мл		
CaCO ₃	25	30	Б	180
Вода		150 мл		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,8	2,16	В	360
Вода		360 мл		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	0,48	Г	360
Вода		360 мл		
Усього				1200

4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

Композиція А: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄×7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5).

Щоб запобігти утворенню осаду фосфатів кальцію та магнію, до складу композиції В додають соляну кислоту (HCl), регулюючи рН розчину до рівня 4,0–4,5. Стерилізацію цієї композиції здійснюють безпосередньо в посівному апараті, оскільки вона потребує вищої температури та тривалішого часу стерилізації порівняно з композицією А. Попередньо солі розчиняють в окремому реакторі, після чого готовий розчин перекачують у посівний апарат, де проводять стерилізацію.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л наведений у табл. 4.3:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 12 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	100	1200	А	3180
Вода		1800 мл		
Конденсат		180 мл		
CaCO ₃	25	300	Б	1950
Вода		1500 мл		
Конденсат		150 мл		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,8	21,6	В	6870
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	4,8		
Вода		6250 мл		
Конденсат		620 мл		
Усього				12000

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л

Для цієї стадії поділ композицій здійснюється аналогічно попередній стадії.

Композиція А: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄×7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л наведений у табл. 4.4:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 120 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	100	12000	А	31,8
Вода		18 л		
Конденсат		1,8		
CaCO ₃	25	3000	Б	19,5
Вода		15 л		
Конденсат		1,5		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,8	216	В	68,7
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	48		
Вода		62,5 л		
Конденсат		6,2 л		
Усього				120

4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Поділ композицій для стадії виробничого біосинтезу здійснюється аналогічно попередній стадії.

Композиція А: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄×7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферменетері об'ємом 2 м³ наведений у табл. 4.5:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 2 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1200 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	100	120	А	318
Вода		180 л		
Конденсат		18		
CaCO ₃	25	30	Б	195
Вода		150 л		
Конденсат		15 л		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,8	2,16	В	687
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	0,48		
Вода		625 л		
Конденсат		62 л		
Усього				1200

4.5. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу глюкозооксидази

Згідно з результатами, наведеними авторами [11], максимальний вихід глюкозооксидази було отримано при регулюванні початкового рН ферментаційного середовища до 5,5. Зміна початкового рН середовища в бік підвищення або зниження спричиняє істотне зниження синтезу ферменту, оскільки рівень рН безпосередньо впливає на ріст і метаболічну активність продуцента *A. niger* NRC9. Зміна рН впливає на іонізацію залишків основних амінокислот активного центру які беруть участь у зв'язуванні субстрату та каталізі. Іонізація цих залишків може спричинити спотворення щілини активного центру і, отже, може опосередковано впливати на активність ферменту.

Отже, регулювання рН під час біосинтезу глюкозооксидази є важливим технологічним чинником, що забезпечує стабільний ріст продуцента та високу активність ферменту. Для підтримання оптимального рівня рН необхідно приготувати титрувальні агенти. Найчастіше для цієї мети застосовують 15%

розчини NaOH та HCl. Зазвичай використовують близько 2 мл титрувального розчину на 1 л середовища. Враховуючи, що у виробничому процесі об'єм середовища становить 1200 л, необхідно підготувати по 2,4 л кожного з титрувальних агентів.

4.6. Обґрунтування вибору піногасника

Зазвичай під час культивування аеробних продуцентів можливе утворення піни через інтенсивну аерацію та перемішування культуральної рідини. У процесі вирощування *A. niger* NRC9 перемішування на рівні 200 об/хв може спричинити піноутворення. Крім того, у поживному середовищі присутній кальцій карбонат, і при його перемішуванні також може формуватися піна.

Піноутворення під час аерованих ферментацій спричинене поверхнево-активними молекулами, які прилипають до бульбашок повітря та стабілізують їх. Утворена піна може змінювати склад поживного середовища через винос компонентів, що адсорбуються на її поверхні. Крім того, підйом піни здатний блокувати стерильні фільтри, що порушує стерильність процесу та може спричинити підвищення тиску в реакторі. Також піна може впливати на мікроорганізми: хоча вони не зазнають механічного руйнування під час лопання бульбашок, однак можуть захоплюватися піною та виноситися з ферментера разом із нею [23].

Механічне руйнування піни базується на впливі напруги зсуву на ламелі бульбашок і включає використання інжекторів, ежекторів, обертювх дисків, крильчаток, мішалок, а також центрифуг і циклонів. Хоча такі системи можуть мати високі експлуатаційні витрати та обмежену ефективність при легкій піни, вони уникають недоліків хімічних піногасників, таких як токсичність, гальмування реакції та негативний вплив на масоперенос. Механічний контроль піни дозволяє підтримувати оптимальні умови аерації та перемішування, знижуючи ризик пошкодження продукту або мікроорганізмів [24].

Хімічні піногасники, навпаки, зменшують поверхневу еластичність і в'язкість піни, але потребують точного дозування та сумісності з живою культурою і аналітичними приладами [24].

Для процесу культивування нашого продуцента механічне піногасіння є найдоцільнішим рішенням, оскільки дозволяє контролювати піноутворення без додавання хімічних агентів, що можуть вплинути на ефективність біосинтезу.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі допоміжні стадії:

- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його в посівному апараті об'ємом 20 та 200 л;

- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівному апараті об'ємом 20 та 200 л;

- приготування 15% розчину HCl для для стабілізації рН під час виробничого біосинтезу у ферментаторі об'ємом 2 м³;

- приготування та стерилізація 15% розчину NaOH для стабілізації рН під час виробничого біосинтезу у ферментаторі об'ємом 2 м³.

Крім того, необхідно передбачити таке обладнання:

- реактор-змішувач об'ємом 5 л для приготування 15% розчину HCl;

- реактор об'ємом 5 л для приготування і стерилізації 15% розчину NaOH;

- реактор об'ємом 5 л для приготування і стерилізації композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі 20 л;

- реактор об'ємом 5 л для приготування і стерилізації композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі 20 л;

- реактор об'ємом 20 л для приготування і стерилізації композиції В для вирощування інокуляту в інокуляторі 20 л;

- реактор об'ємом 50 л для приготування і стерилізації композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі 200 л;

- реактор об'ємом 50 л для приготування і стерилізації композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі 200 л;
- реактор об'ємом 200 л для приготування і стерилізації композиції В для вирощування інокуляту в інокуляторі 200 л;
- реактор об'ємом 500 л для приготування і стерилізації композиції А для виробничого біосинтезу у ферментері 2 м³;
- реактор об'ємом 500 л для приготування і стерилізації композиції Б для виробничого біосинтезу у ферментері 2 м³;
- реактор об'ємом 2000 л для приготування і стерилізації композиції В для виробничого біосинтезу у ферментері 2 м³.

РОЗДІЛ 5

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу глюкозооксидази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування 15% розчину HCl	1	Реактор об'ємом 5 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений мішалкою: 0-460 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,12 кВт; діапазон температур: -120-260 °С; габаритні розміри: 450×480×1500. Виробник: BEIFAN (Китай) https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html
P-2	Реактор-змішувач для приготування 15% розчину NaOH	1	Реактор об'ємом 5 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений мішалкою: 0-460 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,12 кВт; діапазон температур: -120-260 °С; габаритні розміри: 450×480×1500. Виробник: BEIFAN (Китай) https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html
P-3	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор об'ємом 5 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений мішалкою: 0-460 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,12 кВт; діапазон температур: -120-260 °С; габаритні розміри: 450×480×1500. Виробник: BEIFAN (Китай) https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html

НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Глуценко А.В.		
Консульт.				
Керівник		Удимович В.М.		
Н. Контр.				
Зав. каф.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			43	4
Кафедра БТМ				
43				

P-4	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Реактор об'ємом 5 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений мішалкою: 0-460 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,12 кВт; діапазон температур: -120-260 °С; габаритні розміри: 450×480×1500.</p> <p>Виробник: BEIFAN (Китай) https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html</p>
P-5	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	<p>Реактор об'ємом 20 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; діапазон температур: -120-260 °С; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 500×500×1800.</p> <p>Виробник: BEIFAN (Китай) https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/20l-double-layer-stainless-steel-reactor.html</p>
I-6	Інокулятор	1	<p>Інокулятор об'ємом 20 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-300 об/хв; діапазон температур: 0-160 °С; потужність двигуна мішалки: 0,25 кВт; датчики: температури, рН, піни, розчиненого кисню; габаритні розміри: 945×680×1350.</p> <p>Виробник: ПромВіт (Україна) https://promvit.com.ua/fermenter-fr-20-avtomatichne-pinogasinnya-ta-regulyuvannya-ph/</p>
P-7	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	<p>Реактор об'ємом 50 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; діапазон температур: -120-260 °С; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 580×580×2100.</p> <p>Виробник: BEIFAN (Китай) https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/50l-double-layer-stainless-steel-reactor.html</p>
P-8	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Реактор об'ємом 50 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; діапазон температур: -120-260 °С; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 580×580×2100.</p> <p>Виробник: BEIFAN (Китай)</p>

			https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/50l-double-layer-stainless-steel-reactor.html
P-9	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	<p>Реактор об'ємом 200 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 40-2990 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,75 кВт; габаритні розміри: 500×2100. Виробник: (Китай)</p> <p>https://www.alibaba.com/product-detail/100L-200L-500L-1000L-2000L-30KL_1600763133064.html?spm=a2700.7724857.0.0.799a7b87B4ZmxU</p>
H-10	Насос перистальтичний для перекачування композиції В з P-9 до інокулятора I-11	1	<p>Перистальтичний шланговий насос MP-1124-22. Потужність: 0,55 кВт; тиск: до 8 бар; максимальний напір: 10 м; матеріал: поліпропілен; продуктивність: 420 л/год (7 л/хв). Виробник: Debem (Італія)</p> <p>https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-11/</p>
I-11	Інокулятор	1	<p>Інокулятор BZLB-506 об'ємом 200 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 50 - 1000 об/хв; датчики: температури, рН, рО₂, піни, габаритні розміри: 1600×1200×2100. Виробник: Labzee (США)</p> <p>https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-506</p>
P-12	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	<p>Реактор об'ємом 500 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-1200 об/хв; габаритні розміри: 1800×1600×3100. Виробник: ПРОМВІТ (Україна).</p> <p>https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-mlf-rsdp-500-vk/</p>
H-13	Насос мембранний для перекачування композиції А з P-12 до інокулятора I-16	1	<p>Мембранний насос MINIBOXER. Потужність: 0,02 кВт; тиск: 80 м.в.ст; максимальний напір: 9,5 м; матеріал: поліпропілен; продуктивність: 60 л/год. Виробник: Debem (Італія)</p> <p>https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/membranne_nasosu/miniboxer/</p>
P-14	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Реактор об'ємом 500 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-1200 об/хв; габаритні розміри: 1800×1600×3100. Виробник: ПРОМВІТ (Україна).</p>

			https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-mlf-rsdp-500-vk/
H-15	Насос мембранний для перекачування композиції Б з Р-14 до інокулятора І-16	1	Мембранний насос MINIBOXER. Потужність: 0,02 кВт; тиск: 80 м.в.ст; максимальний напір: 9,5 м; матеріал: поліпропілен; продуктивність: 60 л/год. Виробник: Debem (Італія) https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/membrannue_nasosu/miniboxer/
P-16	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор об'ємом 2000 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 40-2990 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,75 кВт; габаритні розміри: 1800×5250. Виробник: (Китай) https://www.alibaba.com/product-detail/100L-200L-500L-1000L-2000L-30KL_1600763133064.html?spm=a2700.7724857.0.0.799a7b87B4ZmxU
H-17	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий MB 140 PP TL-VITON. Потужність: 3 кВт; максимальний напір: 21 м; матеріал: чавун; продуктивність: 40 м ³ /год (666 л/хв). Виробник: Debem (Італія) https://etatronds.com.ua/ua/p2073917534-nasos-tsentrobezhyj-himicheskij.html?source=merchant_center&gad_source=1&gad_campaignid=20147497402&gbraid=0AAAAAouA26MzZsRS2wOzy4AoMdeKPNWba&gclid=CjwKCAiA_dDIBhB6EiwAvzc1cBs9KF-G6kac78AVXuYDZ21NTFZ-jCbujfnmgfifWY1-JTEegV7x_xoCnUsQAvD_BwE
ФР-18	Ферментер	1	Ферментер BZLB-510 об'ємом 2 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою: 50 - 1000 об/хв; датчики: температури, рН, рО ₂ , піни, пробовідбірником, сенсорами рівня, мутності, ОРР, біомаси; СІР/СІР-мийки; габаритні розміри: 3200×2200×3600. Виробник: Labzee (США). https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-510

РОЗДІЛ 6
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ
ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітрязабірною пристрою у найвищій точці – на висоті 18 м.

ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток

Очищення повітря від грубих часток (від ДР 1.1) проводять у фільтрі попереднього очищення, що забезпечує ступінь очищення до 90%. Даний етап дає можливість знизити рівень контамінації повітря за рахунок затримання деякої кількості мікроорганізмів із часточками пилу.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря (від ДР 1.2) здійснюють у компресорі до 0,35-0,5 МПа. Стиснення повітря призводить до підвищення його температури до 120-200°C, а також до збільшення вологовмісту на одиницю об'єму.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача, де охолоджується до температури 25-40°C за допомогою охолодженої води як теплоносія. Потім зайву вологу видаляють за допомогою ресивера. Показник вологості зменшується до 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача, де нагрівається до температури 45-50°C за допомогою пари низького тиску. Показник вологості при цьому зменшується до 50%.

					НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Глуценко А.В.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							47	8
<i>Керівник</i>		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						
					47			

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки, який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення складає 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через подається в індивідуальні фільтри кожного з біореакторів до ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 4.7, ТП 5.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999%.

ДР 2. Приготування кислоти і лугу

ДР 2.1. Підготовка розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 20 та 200 л

Для того, аби приготувати 264 мл 6%-го розчину HCl потрібно у колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндра об'ємом 250 мл додають 222 мл питної води та 42 мл 37%-го розчину соляної кислоти та перемішують.

ДР 2.1.2. Приготування 15%-го розчину HCl для регулювання рН під час виробничого біосинтезу у ферментері на 2 м³

Для того, аби приготувати 2,4 л 15%-го розчину HCl потрібно у реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 5 л внести 1,43 л питної води та 970 мл 37%-го розчину соляної кислоти. Після цього увімкнути перемішувальний пристрій та змішати компоненти.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторах об'ємом 20 та 200 л.

Для приготування 264 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 12,84 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 500 мл і за допомогою мірного циліндра об'ємом 250 мл додають 214 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 15%-го розчину NaOH для регулювання рН під час виробничого біосинтезу у ферментері на 2 м³

Для приготування 2,4 л 15%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 360 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор (P-2) об'ємом 5 л і за допомогою лічильника додають 2,04 л питної води, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв безпосередньо у реакторі.

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

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

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 120 г глюкози. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 750 мл дистильовану воду об'ємом 180 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 30 г CaCO₃. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану холодну воду об'ємом 150 мл та суспендують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 2,16 г (NH₄)₂HPO₄. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 3 л, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл дистильовану воду об'ємом 360 мл, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 0,48 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 750 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл дистильовану воду об'ємом 360 мл, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 20 л

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,2 кг глюкози. Отриману наважку переносять у реактор **(Р-3)** об'ємом 5 л, додають за допомогою лічильника 1,8 л питної води, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 300 г CaCO_3 . Отриману наважку переносять у реактор **(Р-4)** об'ємом 5 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 1500 мл та перемішують за допомогою мішалки. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 21,6 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 4,8 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у реактор **(Р-5)** об'ємом 20 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 6,25 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Одержану композицію самоплином подають в інокулятор **(І-6)** об'ємом 20 л, доводять рН до 4-4,5 6% розчином хлоридної кислоти (від ДР 2.1.1) та стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 200 л

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 12 кг глюкози. Отриману наважку переносять у реактор **(P-7)** об'ємом 50 л, додають за допомогою лічильника 18 л питної води, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3 кг CaCO₃. Отриману наважку переносять у реактор **(P-8)** об'ємом 50 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 15 л та перемішують за допомогою мішалки. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 216 г (NH₄)₂HPO₄, 48 г MgSO₄·7H₂O. Отримані наважки переносять у реактор **(P-9)** об'ємом 200 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 62,5 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Одержану композицію перистальтичним насосом **(H-10)** перекачують в інокулятор **(I-11)** об'ємом 200 л, доводять рН до 4-4,5 6% розчином хлоридної кислоти (від ДР 2.1.1) та стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2 м³

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор у реактор **(P-12)** об'ємом 500 л вносять 120 кг глюкози та додають за допомогою лічильника 180 л питної води, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через ваговий дозатор у реактор **(P-14)** об'ємом 500 л вносять 30 кг CaCO₃ та додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 150 л та перемішують

за допомогою мішалки. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 2,16 кг $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,48 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у реактор **(P-16)** об'ємом 2 м³, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 625 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Одержану композицію перекачують перистальтичним насосом **(Н-17)** у ферментер **(ФР-18)** об'ємом 2 м³, доводять рН до 4-4,5 6% розчином хлоридної кислоти (від ДР 2.1.1) та стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *A. niger* NRC9 підтримують на картопляно-декстрозному агаризованому середовищі (PDA) за температури 2-4 °С. Кожні 2-3 місяці проводять пересіви на свіжоприготоване середовище. Під час робіт із такою колекційною культурою дотримуються правил асептики.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *A. niger* NRC9 (від ТП 4.1) методом виснажувального штриха пересівають на чашки Петрі з агаризованим середовищем PDA для одержання ізолюваних колоній. Культивують в термостаті при $t = 28$ °С (48 год).

ТП 4.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Із чашок Петрі одержані ізолювані колонії продуцента *A. niger* NRC9 від (ТП 4.2) пересівають за допомогою петлі у пробірки зі скошеним середовищем PDA (для засіву 1 пробірки використовують 1 ізолювану колонію). Культивування проводять при 28 °С протягом 24 год.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 3 л з стерильною композицією В (від ДР 3.1.3) вносять композиції А, Б та Г (від ДР 3.1.1, ДР 3.1.2 та ДР 3.1.4), перемішують і розливають за допомогою стерильного циліндра на 250 мл по 150

мл у 8 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *A. niger* NRC9 (від ТП 4.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках при температурі 30 °С упродовж 48 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 3 л.

ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 20 л

В інокулятор (**І-6**) з композицією В (від ДР 3.2.3) самоплином подають композицію А (від ДР 3.2.1) та композицію Б (від ДР 3.2.2), вмикають перемішувачий пристрій. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 4.4). Культивують при температурі 30 °С, подачі стерильного повітря упродовж 48 год, рівень рН, за потреби, регулюють 6%-им розчином НСІ (від ДР 2.1.1) та 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) до 5,5.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 200 л

В інокулятор (**І-11**) з композицією В (від ДР 3.3.3) самоплином подають композицію А (від ДР 3.3.1) та композицію Б (від ДР 3.3.2), вмикають перемішувачий пристрій. Через трубу перетискання перекачують посівний матеріал (від ТП 4.5). Культивують при температурі 30 °С, подачі стерильного повітря упродовж 48 год, рівень рН, за потреби, регулюють 6%-им розчином НСІ (від ДР 2.1.1) та 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) до 5,5.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2 м³

У ферментер (**ФР-18**) з композицією В (від ДР 3.4.3) перекачують за допомогою мембранного насоса (**Н-13**) композицію А (від ДР 3.4.1) та

композицію Б (від ДР 3.4.2), вмикають перемішуючий пристрій. Через трубу перетискування з інокулятора 200 л перекачують посівний матеріал (від ТП 4.6). Культивують при температурі 30 °С, подачі стерильного повітря упродовж 96 год, рівень рН, за потреби, регулюють 15%-им розчином НСІ (від ДР 2.1.2) та 15%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.2) до 5,5.

Кожні 4 год та по завершенню біосинтезу із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення біомаси та активності глюкозооксидази. Технологічний процес завершують по досягненню активності ГО на рівні 170 ОД/мл.

РОЗДІЛ 7

ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ

7.1. Обґрунтування етапу виділення глюконооксидази

Глюконооксидаза *Aspergillus niger* не є внутрішньоклітинним ферментом; вона локалізується переважно в клітинній стінці та асоціюється з позаклітинним простором, що свідчить про її секреторний характер. Водночас значна частина ферменту залишається зв'язаною з міцелієм, у зв'язку з чим у ряді досліджень для підвищення виходу глюконооксидази застосовують механічну дезінтеграцію міцелію з метою вивільнення стінково-асоційованої форми ферменту [25].

7.1.1. Виділення біомаси з культуральної рідини після здійснення біосинтезу

Після завершення ферментації необхідно ефективно розділити міцелій грибів та культуральну рідину для отримання фермент-збагаченого фільтрату. Для відділення біомаси після біосинтезу застосовують різні традиційні методи. Найпоширенішими є центрифугування та фільтрація.

Центрифугування дозволяє швидко відокремити тверду біомасу від культуральної рідини за рахунок різниці густин і забезпечує високу прозорість супернатанту, проте воно є енергозатратним і менш ефективним при великих об'ємах. Крім того, центрифугування може частково пошкоджувати міцелій, що призводить до вивільнення внутрішньоклітинних домішок [26].

Натомість фільтрація (гравітаційна або вакуумна) забезпечує більш м'які умови відділення біомаси та є краще придатною для промислового масштабування. Вона ефективно видаляє клітинні частинки і гіфи, зменшує мутність культуральної рідини та потребує менших енергетичних витрат. З огляду на це, для промислового виробництва глюконооксидази більш доцільним

					НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Глуценко А.В.			РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							55	4
Керівник		Удимович В.М.				55		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

є застосування фільтрації, тоді як центрифугування використовується переважно на лабораторному або пілотному етапах виробництва [26].

Для промислового масштабування більш доцільним є застосування вакуумного барабанного фільтра (Rotary Drum / Disc Filter). Ця система дозволяє безперервно фільтрувати великі об'єми культуральної рідини, ефективно видаляє волокнистий міцелій, зменшує мутність фільтрату та мінімізує механічне пошкодження ферменту, що сприяє збереженню його активності. Використання вакуумного барабанного фільтра є оптимальним компромісом між продуктивністю, якістю фільтрату та економічною доцільністю промислового процесу [27].

7.1.2. Обґрунтування етапу екстракції глюкозооксидази

Після розділення біомаси й отримання культурального фільтрату, збагаченого глюкозооксидазою, наступним етапом технологічного процесу є екстракція ферменту. Метою цього етапу є концентрування глюкозооксидази, зменшення об'єму розчину та часткове відділення ферменту від залишкових білків і метаболічних домішок, підготовка його до подальшого очищення.

Одним із традиційних підходів є осадження солями, найчастіше сульфатом амонію. При цьому молекули білка втрачають частину водної оболонки через зв'язування води сіллю, що спричиняє осадження білків. Осаджені білки відокремлюють центрифугуванням або фільтрацією, отримуючи концентровану ферментну фракцію. Хоча метод простий і економічно доступний, його селективність обмежена: разом із ферментом осаджуються частини домішок, що знижує чистоту початкового екстракту. У деяких дослідженнях повідомляється, що сульфат амонію з рівнем насичення 80 % забезпечував найвищу активність глюкозооксидази [28].

Після осадження проводять діаліз, який дозволяє видалити залишковий сульфат амонію та низькомолекулярні домішки. Використання мембрани з порогом 12 кДа гарантує, що молекули менші за 12 кДа проходять через

мембрану, тоді як бажаний білок залишається всередині мембранного мішка, забезпечуючи концентрацію і часткову очистку ферменту [28].

Сучасні підходи до екстракції глюкозооксидази включають мицелярні та водно-двофазні системи рідина–рідина, які дозволяють переносити фермент у фазу з оптимальними фізико-хімічними умовами. Ці методи забезпечують високу селективність і мінімальне руйнування білкової структури. Наприклад, рідинно-рідинна екстракція із зворотними мицелями дозволяє досягати високого виходу активності ферменту за умови оптимального регулювання рН, іонної сили та складу компонентів системи [29]. Такі підходи особливо доцільні для масштабних промислових процесів, оскільки зменшують втрати активності ферменту та підвищують чистоту кінцевого продукту.

7.2. Обґрунтування етапу очищення глюкозооксидази

Після первинного концентрування глюкозооксидази за допомогою осадження сульфатом амонію та діалізу наступним етапом технологічного процесу є хроматографічне очищення ферменту. Основною метою цього етапу є досягнення фармакологічно та технологічно прийняттого рівня чистоти, а також видалення залишкових білків, пептидів та інших метаболічних домішок.

Одним із найбільш ефективних методів є іонообмінна хроматографія, яка базується на електростатичних взаємодіях між зарядженими молекулами білка та іонообмінною матрицею. Глюкозооксидаза, як білок із певним зарядом при конкретному рН, адсорбується на катіонній або аніонній смолі, тоді як домішки з іншим зарядом проходять через колонку без взаємодії. Регулювання рН та іонної сили розчину дозволяє контролювати селективність сорбції і послідовне елюювання ферменту, отримуючи високочисті фракції. Іонообмінна хроматографія забезпечує не лише очищення, а й концентрування білка, що є особливо важливим для масштабного виробництва [25].

Крім того, для підвищення роздільної здатності та очищення від залишкових домішок може використовуватися гель-фільтраційна хроматографія, яка розділяє молекули за розміром. Цей метод дозволяє відокремити

глюкозооксидазу від низькомолекулярних пептидів та інших дрібних компонентів, при цьому фермент зберігає свою активність та стабільність.

Використання комбінації методів – первинне концентрування осадженням сульфатом амонію та діаліз, а потім селективна очистка за допомогою іонообмінної і, за потреби, гель-фільтраційної хроматографії – забезпечує максимальний вихід активного ферменту при високій чистоті. Така послідовність є оптимальною для промислового виробництва глюкозооксидази, оскільки поєднує економічність, ефективність та збереження біологічної активності [30, 31].

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ

8.1. Мікробіологічний контроль

Під час біосинтезу глюконооксидази продуцентом *A. niger* NRC9 особливу увагу приділяють дотриманню стерильних умов. Для забезпечення мікробіологічної чистоти виробничого процесу здійснюють регулярний моніторинг культуральної рідини з інтервалом у 4 години. Контроль здійснюється за допомогою мікроскопічного аналізу та висівання проб на живильні середовища.

8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища

Перевірка стерильності середовищ

Для виявлення бактеріальної контамінації застосовують м'ясо-пептонний агар (МПА), а для грибів і дріжджів — глюконо-картопляний агар (ГКА) або Сабуро-агар (СА). Такий підхід дає змогу оперативно виявляти сторонні мікроорганізми й підтримувати стабільний перебіг ферментаційного процесу.

Перевірка мікробіологічної чистоти біологічного агента

Із відібраної проби культуральної рідини стерильною бактеріологічною петлею здійснюють висів на чашки Петрі з агаризованим середовищем методом виснаженого штриха з метою отримання ізольованих колоній [32]. Далі чашки інкубують у термостаті за температури, оптимальної для росту продуцента. Після інкубації проводять огляд чашок на наявність сторонньої мікрофлори — мають бути присутні лише колонії *A. niger* NRC9.

Макроскопічне спостереження колоній на картопляно-декстрозному агарі при 25 °С показує, що спочатку вони мають біле забарвлення, яке швидко темнішає внаслідок утворення конідій. Зворотний бік колоній є блідо-жовтим, а їхній ріст може спричинити появу радіальних тріщин в агарі. На агарі з

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 05.01.34 КР ПЗ			
Розроб.		Глущенко А.В.			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							59	5
Керівник		Удимович В.М.				Кафедра БТМ 59		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

солодовим екстрактом (рис. 8.1) після семиденної інкубації при 25 °С та 37 °С формуються злегка коричневі колонії з гладкостінними конідіями. На дріжджовому агарі Чапека (рис. 8.2) після п'яти днів інкубації при 25 °С та 37 °С утворюються чорні колонії з шерстистою поверхнею та гладкостінними конідіями [33].

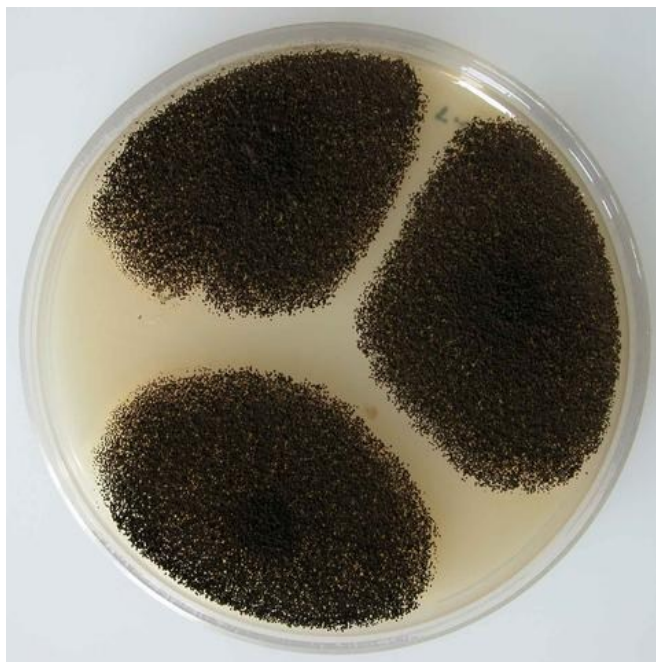


Рис. 8.1. Колонії *Aspergillus niger* NRC9 на агарі з солодовим екстрактом (25°C, 7 днів)



Рис. 8.2. Колонії *Aspergillus niger* NRC9 на агарі Чапека (25°C, 5 днів)

8.1.2. Мікроскопіювання

Мікроскопічну перевірку культуральної рідини виконують за допомогою світлового мікроскопа з імерсійною системою. У стерильних умовах невелику кількість рідини наносять стерильною петлею на попередньо знежирене предметне скло, рівномірно розподіляючи її по поверхні у вигляді мазка діаметром приблизно 1 см. Препарат висушують природним шляхом при кімнатній температурі, уникаючи нагрівання. Після висихання на мазок наносять 1–2 краплі імерсійного масла та проводять спостереження під імерсійним об'єктивом. Після завершення дослідження залишки масла з об'єктива обережно видаляють ватою, змоченою етиловим спиртом.

Під час мікроскопічного аналізу штаму *Aspergillus niger* NRC9 спостерігали характерні морфологічні ознаки. Гіфи мають септовану, двошарову структуру та гіаліновий вигляд. Конідіофори — гіалінові, довжиною 949–1060 мкм, тонко шорсткі, з гладкими стінками, закінчуються конічними везикулами діаметром близько 42 мкм, які несуть один ряд фіалід (14–16 мкм завдовжки). Конідії коричневі, діаметром 3,3–5,2 мкм, формуються у довгі ланцюжки, мають сферичну або яйцеподібну форму, поверхня — гладка або шорстка (рис. 8.3) [34].



Рис. 8.3. Вигляд *Aspergillus niger* NRC9 під мікроскопом (40X)

8.2. Технологічний контроль

8.2.1. Визначення концентрації біомаси *Aspergillus niger* NRC9

Певний об'єм культуральної рідини фільтрують через фільтр Whatman № 4. Так як в поживному середовищі присутній CaCO_3 , рідину підкислюють до рН 2,5 за допомогою 4 М HCl перед фільтрацією, щоб перетворити нерозчинний карбонат кальцію на розчинний хлорид кальцію та вуглекислий газ. Зібрану міцеліальну масу промивають деіонізованою водою та сушать до постійної ваги при 80°C . Концентрацію біомаси виражають в грамах сухої маси клітин на літр [35].

8.2.2. Визначення активності глюкозооксидази

Ферментаційний бульйон фільтрують через марлю, а міцелій подрібнюють та гомогенізують в 0,1 М охолодженому цитрат-фосфатному буфері з рН 7,0. Неочищений екстракт центрифугують при 6000 об/хв протягом 10 хвилин [20].

Після попередньої підготовки 100 мкл розчину ферменту додають до 2 мл 1 М глюкози. До реакційної суміші додають 1 мл 0,1% свіжоприготованого розчину бензохінону та 0,9 мл 0,1 М цитрат-фосфатного буфера з рН 5. Для контролю розчин ферменту замінюють дистильованою водою. Реакційну суміш інкубують при 37°C протягом 10 хвилин. Вивільнений гідрохінон вимірюють при 290 нм. Одну одиницю глюкозооксидази визначають як кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль гідрохінону на мл за хвилину в умовах аналізу [11].

8.2.3. Концентрація джерела Карбону (глюкоза) у середовищі

Джерелом вуглецю в поживному середовищі слугувала глюкоза, вміст якої визначали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням колонки Aminex HPLC-87H (BioRad) при температурі 25°C . Для детекції застосовували ультрафіолетовий детектор та детектор показника заломлення (Techlab, Німеччина). Як рухомих фаз використовували 5 мМ сірчану кислоту зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв. Додатково концентрацію

глюкози визначали за допомогою глюкометра (Yellow Springs, Огайо, США) [36].

8.2.4. Визначення концентрації джерела Нітрогену (сульфат амонію) у середовищі

Джерелом амонійного азоту в поживному середовищі є сульфат амонію. Для його визначення зазвичай застосовують метод із використанням реактиву Несслера. З метою визначення концентрації амонію в культуральному середовищі до 1 мл зразка, попередньо розведеного свіжим середовищем BG-11 без хлориду амонію, додають 50 мкл реактиву Несслера (Sigma). Одразу після цього вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі 395 нм. Концентрацію амонію розраховують за калібрувальною кривою, побудованою на основі стандартів хлориду амонію в діапазоні 30–200 пМ у середовищі BG-11. Результати подають як середні значення з трьох до шести вимірювань, проведених на зразках з двох незалежних культур [37].

СПИСОК ВИРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Adrio, J. L., & Demain, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*. 2014, 4 (1): 117–139. doi: <https://doi.org/10.3390/biom4010117>
2. Mayel M, Abah MA, Ayo GF, et al. Production of glucose oxidase from *Aspergillus Niger* using yam peels as carbon source. *Int J Mol Biol Open Access*. 2025, 8(1): 1-6. doi: [10.15406/ijmboa.2025.08.00190](https://doi.org/10.15406/ijmboa.2025.08.00190)
3. Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., Shukla, S., Upadhyay, R. S., Bueno-Mari, R., & Bajpai, V. K. Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01032>
4. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*. 2009, 27(4): 489–501. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>
5. Chun Ming Wong; Kwun Hei Wong; Xiao Dong Chen. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. 2008, 78(6): 927–938. doi:10.1007/s00253-008-1407-4
6. Bauer, J. A., Zámocká, M., Majtán, J., & BauEROVÁ-HlinkOVÁ, V. Glucose Oxidase, an Enzyme "Ferrari": Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules*. 2022, 12(3): 472. doi: <https://doi.org/10.3390/biom12030472>
7. Khatami, S. H., Vakili, O., Ahmadi, N., Soltani Fard, E., Mousavi, P., Khalvati, B., Maleksabet, A., Savardashtaki, A., Taheri-Anganeh, M., & Movahedpour, A. Glucose oxidase: Applications, sources, and recombinant production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2021. doi: <https://doi.org/10.1002/bab.2165>
8. Vitolo, M. Overview on glucose oxidase. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2021, 10(14): 130-155.

9. Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. *et al.* Optimization of *Aspergillus niger* Fermentation for the Production of Glucose Oxidase. *Food Bioprocess Technol.* 2009, 2: 344–352. doi: <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0050-x>
10. Haq, I. U., Nawaz, A., Mukhtar, H., & Ahmed, W. Isolation and identification of glucose oxidase hyper producing strain of *Aspergillus niger*. *British Microbiology Research Journal.* 2014, 4(2): 195.
11. Farid, M.A., Ghoneimy, E.A., El-Khawaga, M.A. *et al.* Statistical optimization of glucose oxidase production from *Aspergillus niger* NRC9 under submerged fermentation using response surface methodology. *Ann Microbiol.* 2013, 63: 523–531. doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0497-5>
12. Haq, I. U., Nawaz, A., Mukhtar, H., Mansoor, Z., Riaz, M., Ahmed, M., & Ameer, S. M. Random mutagenesis of *Aspergillus niger* and process optimization for enhanced production of glucose oxidase. *Pak. J. Bot.* 2014, 46(3): 1109-1114.
13. Murtaza, G., Riaz, S., Zafar, M., Ahsan Raza, M., Kaleem, I., Imran, H., Al-Harbi, A., Sabouri, A., Asim Niaz, T., & Bashir, S. (2024). Examining the growing challenge: Prevalence of diabetes in young adults (Review). *Medicine International*, 5(1). <https://doi.org/10.3892/mi.2024.201>
14. Kirk, J. K., & Stegner, J. (2010). Self-monitoring of blood glucose: practical aspects. *Journal of diabetes science and technology*, 4(2), 435–439. <https://doi.org/10.1177/193229681000400225>
15. Ewunetu, M., Belay, B. M., Abere, Y., Melkamu, B., Eshetie, Y., & Dires, T. (2025). Home self monitoring of blood glucose using a glucometer and its determinants among diabetes mellitus. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-02196-4>
16. Yoo, E. H., & Lee, S. Y. (2010). Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 10(5), 4558–4576. <https://doi.org/10.3390/s100504558>
17. Про діабет [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://diabet.fund.ua/about-diabetes/>

18. Strack, S., Papadopoulos, G., & Reimann, D. (2018). Printed test strips to determine glucose concentration in aqueous liquids (WO2018194964A1). *World Intellectual Property Organization*.
<https://patents.google.com/patent/WO2018194964A1/en>
19. Глюкозооксидаза [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://enzim.shop/gljukozyksydaza.html>
20. Глюкозооксидаза E1102 [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://selitra.biz/uk/p752516663-gljukozyksydaza-e1102.html?srsltid=AfmBOooC4v24w_S8PGFUKavFd6rtlDzIzfUeUZ2fh-EEwJ8duv0QWYGO
21. Singh, S., Sithole, B., Lekha, P., Permaul, K., & Govinden, R. (2021). Optimization of cultivation medium and cyclic fed-batch fermentation strategy for enhanced polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus thuringiensis* using a glucose-rich hydrolyzate. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1).
<https://doi.org/10.1186/s40643-021-00361-x>
22. Карлаш, Ю. В. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Національний університет харчових технологій. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.
<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/39521>
23. Tiso, T., Demling, P., Karmainski, T., Oraby, A., Eiken, J., Liu, L., Bongartz, P., Wessling, M., Desmond, P., Schmitz, S., Weiser, S., Emde, F., Czech, H., Merz, J., Zibek, S., Blank, L. M., & Regestein, L. (2024). Foam control in biotechnological processes—challenges and opportunities. *Discover Chemical Engineering*, 4(1). <https://doi.org/10.1007/s43938-023-00039-0>
24. Rafati Atri, Majid & Ashrafizadeh, Seyed Nezameddin. (2010). The importance of foams and antifoaming in bioprocesses. *Pakistan Journal of Biotechnology*. 7. 19-39.
https://www.researchgate.net/publication/288105431_The_importance_of_foams_and_antifoaming_in_bioprocesses

25. INDRIANI, A., AMBARSARI, L., & SESWITA ZILDA, D. (2018). Purification and Characterization of Glucose Oxidase of *Aspergillus niger* IPBCC.08.610. *Microbiology Indonesia*, 12(2), 43–48. <https://doi.org/10.5454/mi.12.2.2>
26. Kalyanpur M. (2002). Downstream processing in the biotechnology industry. *Molecular biotechnology*, 22(1), 87–98. <https://doi.org/10.1385/MB:22:1:087>
27. Perlmutter, B. A. (2015). Types of Filtration Systems. *Solid-Liquid Filtration*, 35–45. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803053-0.00003-1>
28. Ramadhan, Z. M., & Mohsen, A. H. (2022). Extraction and purification of glucose oxidase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *International journal of health sciences*. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6ns4.12007>
29. Zhang, X., Han, M., Han, S., & Zong, W. (2025). Aqueous two-phase system (ATPS): from basic science to applications. *RSC advances*, 15(12), 9041–9054. <https://doi.org/10.1039/d4ra08232j>
30. Sultan, Hafiz Muhammad & Batool, Laiba & Hussain, Inza & Sabir, Misbah & Mujahid, Rabail & Mazhar, Mahnoor. (2025). An overview of protein purification strategies and applications. 2. 98-112. 10.22034/MEDMEDCHEM.2025.531293.1037.
31. Paloyan, A. M., Dukova, K. G., & Hambardzumyan, A. A. (2023). Characterization of glucose Oxidase from *Penicillium chrysogenum* MDC 8358: Prospects for application in food industry. *Functional Foods in Health and Disease*, 13(11), 616. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v13i11.1216>
32. Пирог, Т. П. Становлення та розвиток мікробіології / Т. П. Пирог // Загальна мікробіологія : підручник. - 2 вид., доп. і перероб. - Київ : НУХТ, 2010. - С. 6-20.
33. Sengupta, S. (2019, August 3). *Aspergillus niger*. *Microbe Notes*. <https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>

34. Haq, I. U., Nawaz, A., Mukhtar, H., & Ahmed, W. Isolation and identification of glucose oxidase hyper producing strain of *Aspergillus niger*. *British Microbiology Research Journal*. 2014, 4(2): 195
35. Hatzinikolaou, D. G., Hansen, O. C., Macris, B. J., Tingey, A., Kekos, D., Goodenough, P., & Stougaard, P. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Applied microbiology and biotechnology*. 1996, 46(4): 371–381. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00166232>
36. Hellmuth, K., Pluschkell, S., Jung, J. K., Ruttkowski, E., & Rinas, U. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* using genetic- and process-engineering techniques. *Applied microbiology and biotechnology*. 1995, 43(6): 978–984. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00166912>
37. Liotenberg, S., Campbell, D., Rippka, R., Houmard, J., & de Marsac, N. T. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology (Reading, England)*. 1996, 142 (3): 611–622. doi: <https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-611>