

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

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

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

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

« _____ » _____ 2025 р.

« _____ » _____ 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**
зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія» _____
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми _____ «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна» _____
на тему: _____ Біосинтез ліпази *Rhizopus oryzae* _____

Виконала: здобувача IV курсу, групи 2

_____ БІРЮКОВА Анастасія Валеріївна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

Рецензент _____ (ім'я та прізвище) _____ (підпис)
_____ (ім'я та прізвище) _____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“01” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БІРЮКОВОЇ Анастасії Валеріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез ліпази *Rhizopus oryzae*»

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, доцент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 14 червня 2025 року

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Rhizopus oryzae*; цільовий продукт: ліпаза; геометричний об'єм ферментера: 25 м³; коефіцієнт заповнення: 0,54.

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу ліпази - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу ліпази - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03 2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	01.03.25-28.05.2025	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	01.03.25-28.05.2025	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	01.03.25-28.05.2025	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	01.03.25-28.05.2025	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	01.03.25-28.05.2025	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	01.03.25-28.05.2025	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	01.03.25-28.05.2025	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	01.03.25-28.05.2025	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	01.03.25-28.05.2025	

Здобувач _____

(підпис)

Анастасія БІРЮКОВА _____

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____

(підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ _____

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу ліпази *Rhizopus oryzae* ZAC3, який під час культивування синтезує ліпазу, ферментативна активність якої сягає 31.46 од/мл в культуральній рідині. Ліпазу пропонується використовувати для забезпечення 10% потреб Рожищенського сирзаводу у виробництві сирів. Розрахована потужність виробництва становить 34,675 кг (933,5 м³ культуральної рідини) ліпази за рік.

Технологія виробництва ліпази включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування 15%-го розчину соляної кислоти, приготування та стерилізація 15%-го розчину натрію гідроксиду для регуляції рН перед внесенням посівного матеріалу, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 25, 250 л та 2,5 м³ та біосинтез у ферментері об'ємом 25 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,54)). Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методики контролю концентрації біомаси, ферментативної активності цільового продукту (ліпази), амінного азоту та джерела вуглецю.

Кваліфікаційна робота викладена на 93 сторінках, містить 17 таблиць, 4 рисунків, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (52 Найменування), технологічної (формат А2, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: ліпаза, фермент, *Rhizopus oryzae* ZAC3, біосинтез.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and apparatus schemes for lipase biosynthesis of *Rhizopus oryzae* ZAC3, which synthesizes lipase during cultivation, the enzymatic activity of which reaches 31.46 U/ml in the culture liquid. It is proposed to use lipase to meet 10% of the needs of the Rozhyshche cheese factory in the production of cheeses. The estimated production capacity is 34.675 kg (933.5 m³ of culture fluid) of lipase per year.

Lipase production technology includes ancillary work (preparation of sterile aeration air, preparation of 15% hydrochloric acid solution, preparation and sterilization of 15% sodium hydroxide solution for pH control before inoculation, preparation and sterilization of culture media) and technological process (four stages of growing seed (in flasks on rolling pins, in inoculators with a volume of 25, 250 l and 2.5 m³ and biosynthesis in a fermenter with a volume of 25 m³ with a filling factor of 0.54)). A map of post-fermentation control of pre-fermentation processes and industrial biosynthesis has been developed, and methods for controlling the concentration of biomass, enzymatic activity of the target product (lipase), amine nitrogen and carbon source have been indicated.

The qualification work is presented on 93 pages, contains 17 tables, 4 figures, consists of an introduction, nine chapters, a list of used literature (52 Names), technological (format A1, 1 sheet) and hardware (format A1, 1 sheet) diagrams.

Keywords: lipase, enzyme, *Rhizopus oryzae* ZAC3, biosynthesis.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента..	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	19
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	21
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	22
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	23
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів..	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	29
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	33
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента...33	
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	37
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	41
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	41
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря....	42
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	44
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів...44	
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів.....	50
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища....	55
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	62
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....	68
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту.....	78

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.....	82
9.1. Мікробіологічний контроль.....	82
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	82
9.2.1. Концентрація біомаси.....	82
9.2.2. Концентрація цільового продукту.....	83
9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	84
ЛІТЕРАТУРА.....	87

ВСТУП

Мікробні ліпази – це ферменти, що належать до класу гідролаз (ЕС 3.1.1.3), синтезуються мікроорганізмами (бактеріями, грибами та дріжджами), каталізують гідроліз тригліцеридів до гліцеролу та вільних жирних кислот. Вони характеризуються високою ферментативною активністю, широким спектром субстратної специфічності, стабільністю в різноманітних умовах та легкістю масштабування виробництва [1].

Виробництво ферментних препаратів займає одне з провідних місць у сучасній біотехнології і належить до галузей, обсяг продукції яких постійно зростає, а сфера застосування розширюється. У сучасних біотехнологіях ферменти відіграють ключову роль у багатьох галузях промисловості, зокрема в харчовій, фармацевтичній та хімічній сферах. Ліпази використовують у виробництві біодизеля, миючих засобів, косметики, а також мають широке застосування у харчовій промисловості [2].

Сучасна харчова промисловість постійно знаходиться в пошуку інноваційних та сталих рішень для оптимізації виробничих процесів, підвищення якості продукції та задоволення зростаючих вимог споживачів. У процесі сироваріння одним з ключових ферментів є ліпаза, що відіграє вирішальну роль у формуванні смаку та аромату сирів шляхом гідролізу тригліцеридів молока. Традиційно для цих цілей використовувалися тваринні ліпази, переважно отримані з передшлунків молодих жуйних тварин. Однак, зростаючі етичні міркування, потенційні ризики, пов'язані з наявністю алергенів, а також нестабільність поставок та коливання цін на сировину, зумовлюють нагальну потребу в пошуку альтернативних джерел отримання цього ферменту [3].

					НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бірюкова А. В.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					8	2
Реценз.		Пухляк А. Г.						
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						
					Кафедра БТМ			

Мікробні ліпази виступають як перспективна та екологічно чиста альтернатива тваринним аналогам. Вони характеризуються високою ферментативною активністю, широким спектром субстратної специфічності, стабільністю в різноманітних умовах та легкістю масштабування виробництва [4]. Перспективний продуцент ліпази, штам гетероталічних міцеліальних грибів *Rhizopus oryzae* ZAC3, добре відомий своєю здатністю продукувати високоактивні ліпази з бажаними для харчової промисловості характеристиками.

Актуальність виробництва цільового продукту – мікробної ліпази, синтезованої *Rhizopus oryzae*, для використання в сироварінні, є очевидною. На сьогодні мікробну ліпазу саме для харчової промисловості в Україні не виробляє жодне вітчизняне підприємство. Попит на ферменти для харчової промисловості невпинно зростає, і мікробні ліпази, зокрема отримані з *Rhizopus oryzae*, здатні не лише замінити тваринні аналоги, а й відкрити нові можливості для створення сирів з унікальними смаковими профілями. Використання мікробної ліпази дозволить сироварам отримати більший контроль над процесом дозрівання сиру, стандартизувати якість продукції та задовольнити потреби споживачів.

Таким чином, виробництво мікробної ліпази *Rhizopus oryzae* має великий потенціал функціонального і економічно доцільного замітника тваринних ліпаз у сироварінні, що відкриває широкі перспективи для розвитку інноваційних технологій у молочній галузі.

Мета кваліфікаційної роботи – проектування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) ліпази штамом *R. oryzae* ZAC3.

Новизною даної роботи є використання як біологічного агента вискоєфективного штаму міцеліальних грибів *Rhizopus oryzae* ZAC3 для отримання ліпази з метою забезпечення потреб у цьому ферменті Рожищенського сирзаводу при виготовленні сирів.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Ліпази є дуже універсальними ферментами, і їх виробляють у кількох промислових процесах. Ліпазу можна отримати з кількох джерел: тваринного, рослинного та мікробіологічного [5].

Фундаментальні переваги мікробних ліпаз зумовлені їх багатофункціональним застосуванням і зручністю для масового виробництва. Крім того, мікробні ліпази мають велике значення через їх легкість очищення, молекулярну модифікацію, високу активність, стабільність і можливість безперервного виробництва порівняно з ліпазами тваринного і рослинного походження. У комерційних цілях зазвичай використовують ліпази, синтезовані грибами, дріжджами і бактеріями [5].

Ліпази проявляють специфічність відносно оптичних ізомерів естерів (стереоспецифічність), позиційну, гліцеридну і жирокислотну специфічність.

За позиційною специфічністю ліпази поділяють на дві групи: позиційно неспецифічні, які звільняють в процесі гідролізу тригліцеридів жирні кислоти з усіх трьох позицій, і 1,3-специфічні. Більшість відомих ліпаз переважно гідролізують естерний зв'язок біля C_1 і C_3 гліцеролу. За тривалого гідролізу гліцеридів 1,3-специфічні ліпази здатні відщепити жирні кислоти з усіх положень, оскільки 2-моногліцериди і 1,2-дигліцериди, як менш конформаційно стабільні, мимоволі ізомеризуються в 1-моногліцериди і 1,3-дигліцериди [7].

Жирнокислотна специфічність ліпаз виражається в перевазі до жирних кислот певної довжини ланцюга. В цілому ліпази легко відділяють жирні кислоти середньої довжини [7].

Ліпази різного походження сильно відрізняються одна від одної за специфічністю дії, спорідненістю до різних субстратів, розчинністю, оптимуму рН й іншим властивостям [7].

					НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бірюкова А. В.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					10	4
Реценз.		Пухляк А. Г.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						



Рис.3.1. Кристалічна структура ліпази *Rhizopus microsporus var. chinensis* [8]

Вперше мікробну ліпазу було синтезовано у 1901 році німецьким мікробіологом Йоганном Генріхом Вейгелем (Johann Heinrich Weigel), який виділив її з культури бактерій *Bacillus prodigiosus* (сьогодні відома як *Serratia marcescens*). Це відкриття стало важливою віхою в розвитку біотехнології, оскільки мікробні ліпази виявилися ефективними біокатализаторами, які широко застосовуються в харчовій, фармацевтичній, хімічній та інших промисловостях [9].

Фізико-хімічні властивості ліпаз мікробного походження [6] наведено нижче у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Фізико-хімічні властивості ліпази

Властивість	Опис
Молекулярна маса	від 20 кДа до 72 кДа
Оптимальний рН	5,0-9,0 (залежно від джерела ферменту)
Температурна стабільність	до 60°C
Субстратна специфічність	триацилгліцероли, естери жирних кислот
Розчинність	розчинна у воді та буферних розчинах

Фармаколого-біохімічні властивості ліпази

Ліпази, будучи гідролазами карбонових ефірів, демонструють широкий спектр біохімічних властивостей, що визначають їхню каталітичну активність та специфічність. Їхня здатність гідролізувати складні ліпіди, зокрема

тригліцериди, до гліцеролу та вільних жирних кислот, є ключовою в метаболізмі ліпідів у живих організмах [10].

Механізм дії ліпаз зазвичай включає каталітичну тріаду, що складається із залишків серину, гістидину та аспартату (або глутамату), яка забезпечує нуклеофільну атаку на карбонільний атом вуглецю ефірного зв'язку. Важливим аспектом є міжфазна активація ліпаз, коли вони адсорбуються на межі розділу вода-олія, що призводить до конформаційних змін у ферменті та відкриття гідрофобної каталітичної ділянки, роблячи її доступною для субстрату. Це робить їх ефективними біокаталізаторами в органічному синтезі, зокрема в реакціях естерифікації, трансестерифікації та амінолізу [11].

На ліпазну активність значно впливають фактори навколишнього середовища, такі як температура, рН та наявність іонів металів, що зумовлює різноманітність оптимальних умов для функціонування різних типів ліпаз [12].

Ліпази демонструють широкий субстратний спектр, включаючи гідроліз ефірів холестерину, фосфоліпідів та жиророзчинних вітамінів [13].

Використання ліпази в різних галузях промисловості

Основну частину промислово важливих ферментів світового ринку на сьогодні становлять гідролази. Ліпази (триацилгліцеролгідролази КФ 3.1.1.3) як гідролітичні ферменти можуть використовуватись у багатьох галузях промисловості, де необхідний частковий або повний гідроліз жирів та олій [14].

Застосування ліпаз набуло широкого поширення, і на сьогодні можна виокремити не менше десяти галузей, де ці ферменти — тваринного або мікробного походження — використовуються досить успішно: 1) харчова промисловість — сироваріння, виробництво хліба, круп'яних і макаронних виробів, кондитерська промисловість (виробництво молочного шоколаду, гідроліз залишкового жиру в сухому яєчному білку), приготування безалкогольних напоїв, виробництво рослинних олій; 2) легка промисловість — обробка хутра та шкіри, виробництво шовку; 3) побутова хімія — виробництво мийних засобів; 4) медицина — на сьогодні як терапевтичні засоби

використовують ліпази тваринного походження, одержані з підшлункової залози; 5) очищення стічних вод і каналізаційних комунікацій, утилізація відходів масложирової промисловості; 6) препаративна хімія та біохімія; 7) косметична промисловість; 8) сільське господарство — для приготування легкозасвоюваних кормів і для поліпшення обміну речовин у тварин; 9) використання іммобілізованих ліпаз при виробництві гліцерину, жирних кислот, моно- та дигліцеридів, у жиропереробці (ензимна переестерифікація); 10) отримання біодизелю ліпазним каталізом [14].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Найбільш перспективне задоволення потреб у ліполітичних препаратах з високою активністю і низькою собівартістю забезпечується їх виробництвом за допомогою мікробного синтезу. Перевага даного методу отримання ферментів полягає у високій швидкості росту, потужному ферментному апараті та у можливості проводити генетичні маніпулювання з мікроорганізмами.

Активні продуценти ліпаз виявлено серед бактерій родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Geobacillus*; актиноміцетів — *Streptomyces flavogriseus*, *Thermoactinomyces vulgaris*. Згідно літературних даних, ефективними продуцентами ліпази є дріжджові культури родів *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulospora*, *Trichosporon*. Високою ліполітичною активністю характеризуються мікроскопічні гриби родів: *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Eurotrium* [14].

Серед кількох груп мікроорганізмів, що синтезують ліпази для промислового застосування, найбільш вигідними продуцентами є гриби завдяки низькій ключовій перевазі. По-перше, багато грибів, зокрема *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*, продукують ліпази екстрацелюлярно, що значно спрощує процеси екстракції та очищення ферментів, знижуючи при цьому витрати виробництва. По-друге, грибні ліпази демонструють високу термо- та рН-стабільність, широкий спектр субстратної специфічності, а також активність у органічних розчинниках, що робить їх універсальними біокатализаторами для різних галузей.

Виробництво ліпази грибами зазвичай виконується за допомогою процесів твердофазної ферментації, що є надзвичайно економічним методом [15].

НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бірюкова А. В.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					14	9
Реценз.		Пухляк А. Г.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Крім *Rhizopus oryzae*, для порівняння було обрано кілька мікроорганізмів, здатних до синтезу ліпази на суміші ростових субстратів (табл. 2.1.).

Ліпаза, синтезована штамом міцеліальних грибів *Rhizopus oryzae* ZAC3 характеризується найвищою ферментативною активністю (31.46 од/мл) серед усіх запропонованих продуцентів. Умови культивування та склад поживного середовища не є складними, а час культивування не є досить тривалим та становить 96 годин [16].

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

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Ферментативна активність, Од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Rhizopus oryzae</i> ZAC3	Дріжджовий екстракт Ксилроза NaCl CaCl ₂ ·2H ₂ O Оливкова олія	10,0 10,0 0,5 0,5 10	96	31.46	Культивування у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл поживного середовища на качалці (t = 45°C; pH = 5.0; n=150 об/хв).	Ayinla ZA, Ademakinwa AN, Agboola FK. Studies on the Optimization of Lipase Production by <i>Rhizopus sp.</i> ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. J App Biol Biotech. 2017; 5 (02): 030-037. DOI: 10.7324/JABB.2017.50205
<i>Aspergillus niger</i> C	Сахароза (NH ₄) ₂ SO ₄ Соєва олія Дріжджовий екстракт	15,0 4,0 4,0 1,0	72	27.46	Культивування у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл поживного середовища на качалці (t = 32°C; pH = 5.0; n = 150 об/хв).	Lima, L. G. R., Gonçalves, M. M. M., Couri, S., Melo, V. F., Sant'Ana, G. C. F., & Costa, A. C. A. D. (2019). Lipase production by <i>Aspergillus niger</i> C by submerged fermentation. <i>Brazilian Archives of Biology and Technology</i> , 62, e19180113. DOI: https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180113
<i>Candida rugosa</i> NCIM 3462	Глюкоза Арахісова олія Пептон (NH ₄) ₂ SO ₄ FeCl ₃ ·6H ₂ O	19,604 13,065 7,473 0,962 0,0019	60	5.95	Культивування в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл поживного середовища на качалці (t = 30°C; pH = 6.5; n = 150 об/хв)	Rajendran, A., & Thangavelu, V. (2007). Optimization of medium composition for lipase production by <i>Candida rugosa</i> NCIM 3462 using response surface methodology. <i>Canadian journal of microbiology</i> , 53(5), 643–655. DOI: https://doi.org/10.1139/W07-017

Представлена порівняльна характеристика (див. табл. 2.1) є недостатньою для визначення усіх переваг культивування мікроорганізмів. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента потрібно порівняти вартість приготування 1 літра поживного середовища, що використовуються для культивування продуцентів згідно порівняльної характеристики (табл. 2.1).

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)*
1	2	3	4	5	6
<i>Rhizopus oryzae</i> ZAC3	Дріжджовий екстракт	10	703	7,03	1
	Ксилоза	10	251	2,51	2
	NaCl	0,5	15,90	0,00795	3
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	19	0,0095	4
	Оливкова олія	10	166	1,66	5
Вартість 1 л середовища – 11,22 грн.					
<i>Aspergillus niger</i> C	Сахароза	10,0	180	1,8	6
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	20,40	0,102	6
	Соева олія	5,0	260	1,3	7
	Дріжджовий екстракт	15	703	10,545	1
Вартість 1 л середовища – 13,75 грн.					
<i>Candida rugosa</i> NCIM 3462	Глюкоза	19,604	55	1,078	4
	Арахісова олія	13,065	290	3,79	7
	Пептон	7,473	1320	9,864	6
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,962	20,40	0,02	6
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,0019	350	0,0007	7
Вартість 1 л середовища – 14,75 грн.					

Примітка. * – Ціни наведено станом на травень 2025 р.

1 – <https://vianoksgel.ua/ua/> ; 2 – <https://soda.kiev.ua/ua/> ;

3 – <https://himfarminvest.com.ua> ; 4 – <https://flagma.ua/uk/> ;

5 – <https://shustro.in.ua/> ; 6 – <https://www.systopt.com.ua> ;

7 – <https://prom.ua/ua/> .

Дані, наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування

Aspergillus niger C є дорожчим, аніж середовище для культивування *Rhizopus oryzae* ZAC3, а також ліпаза, синтезована *A. niger* C, має менший показник ферментативної активності. Слід зазначити, що середовище для культивування *Candida rugosa* NCIM 3462 є найдорожчим за вартістю, і даний продуцент синтезує ліпазою із найнижчою активністю, яка є у 5.3 рази меншою у порівнянні з активністю ліпази, що продукується *R. oryzae* ZAC3.

Аби остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розрахуємо умовну вартість одиниці активності цільового продукту – ліпази.

Нижче наведено таблицю 2.3, де розраховано умовну вартість одиниці активності ферменту ліпази трьох обраних продуцентів – *Rhizopus oryzae* ZAC3, *Aspergillus niger* C та *Candida rugosa* NCIM 3462

Таблиця 2.3

Умовна вартість одиниці активності ферменту ліпази

Біологічний агент	Ферментативна активність (од/мл)	Тривалість культивування, год	Кількість одиниць активності, синтезованих за год	Вартість 1 л середовищ (грн./л)	Умовна вартість одиниці активності (грн/од)
<i>Rhizopus oryzae</i> ZAC3	31.46	96	0,3277	11,22	0,357
<i>Aspergillus niger</i> C	27.46	72	0,38	13,75	0,501
<i>Candida rugosa</i> NCIM 3462	5.95	60	0,099	14,75	2,478

Проаналізувавши усі вищенаведені дані, можна зробити висновок, що одержання ліпази штамом міцеліальних грибів *Rhizopus oryzae* ZAC3 є найраціональнішим, адже даний продуцент на найдешевшому поживному середовищі синтезує ліпазу, яка характеризується найнижчою вартістю одиниці активності.

Підрозділ 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування продуцента *Rhizopus oryzae* ZAC3 становить 96

годин, ферментативна активність ліпази – 31.46 Од/мл, а концентрація біомаси – 2.61 г/л [16].

Фермент ліпаза належить до класу гідролаз, концентрація яких в культуральній рідині становить від 1,0 до 1,5 г/л [17]. Для подальших розрахунків приймаємо, що *R. oryzae* ZAC3 продукує ліпазу з концентрацією 1,04 г/л в культуральній рідині.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу ліпази. Як джерело вуглецю для отримання ліпази використовують моносахарид, що належить до групи пентаз-ксилозу («деревний цукор»). Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 1,04 г ліпази. Молекулярна маса ліпази *Rhizopus oryzae* становить близько 29 кДа, тому розрахувати точний вміст Карбону у молекулі цього фермента неможливо. Тому приймаємо, що вміст Карбону в ліпазі становить 50% (як у складі практично всіх органічних сполук) – $1,04 \times 0,5 = 0,52$ г.

Далі розрахуємо, у скількох грамах ксилози міститься 0,52 г Карбону. Молекулярна маса ксилози [C₅H₁₀O₅] становить 150,13. У 150,13 г ксилози міститься 60 г Карбону, а 0,52 г Карбону міститься у $(0,52 \times 150,13) / 60 = 1,3$ г ксилози. Враховуючи, що при вирощування мікроорганізмів близько 40% субстрату окислюється до CO₂ для одержання енергії, що необхідна для конструктивного метаболізму, вміст ксилози у середовищі становитиме $(1,3 \times 0,4) + 1,3 = 1,82$ г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу біомаси. Як джерело вуглецю для одержання ліпази використовується ксилоза. Оскільки у біомасі міститься 50 % Карбону, то вміст Карбону у 2,61 г біомаси становить $2,61 \times 0,5 = 1,305$.

Така кількість Карбону міститься у $(1,305 \times 150,13) / 60 = 3,265$ г ксилози. Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для отримання 2,61 г біомаси у поживне середовище потрібно внести $(3,265 \times 0,4) + 3,265 = 4,571$ г/л ксилози.

Отже, загальний вміст ксилози, необхідний для синтезу біомаси (2,61 г/л) та ліпази (1,04 г/л), становить $1,82 + 4,571 = 6,391$ г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 2,61 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,261 г.

Продуцент ліпази асимілює як джерело азотного живлення аміний Нітроген. Для одержання ліпази в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело амінного азоту дріжджовий екстракт. Таким органічним азотом є аміний азот і частково білковий (зокрема, коротколанцюгові поліпептиди). У ньому міститься близько 50% білків. Як відомо, для хімічного складу білків характерний постійний середній вміст Нітрогену – близько 16%. Розрахуємо кількість білку, в якій міститься 0,261 г Нітрогену.

У 100 г білку міститься 16 г Нітрогену, тож 0,261 г Нітрогену міститься в $(100 \times 0,261) / 16 = 1,63$ г білку.

У перерахунку на дріжджовий екстракт одержимо 3,26 г/л.

Розрахунок вмісту Фосфору в середовищі

У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 2,61 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $2,61 \times 0,03 = 0,078$ г/л. Основним джерелом Фосфору у промисловому виробництві ліпази є дріжджовий екстракт, що містить від 0,5% до 2% фосфору від сухої маси. Для подальших розрахунків візьмемо середнє значення. Приймаємо, що вміст Фосфору в дріжджовому екстракті становить 1%.

Таким чином, для синтезу 2,61 біомаси, що містить 3% Фосфору, треба внести близько 7,83 г/л дріжджового екстракту у поживне середовище.

Отже, обране поживне середовище для культивування *Rhizopus oryzae* ZAS3 не потребує корегування, бо містить усі необхідні джерела макро- та мікроелементів в достатній кількості для вирощування продуцента.

Підрозділ 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Міцелій *R. oryzae* ZAC3 утворюється широкими (5-18 мкм)

багатоядерними гіфами, що переважно не мають перегородок. Субстратні гіфи формують столони, від яких відходять ризоїди – коренеподібні вирости, що забезпечують прикріплення до субстрату. Зі столонів формуються прямі або злегка вигнуті спорангіофори завдовжки 210-2500 мкм, що симетрично розташовані проти ризоїдів. На кінцях спорангіофорів формуються великі кулеподібні спорангії діаметром 60-180 мкм, що з часом набувають чорного кольору. Всередині них розташовані колумели (30-110 мкм) овальної форми. Під колумелою розташована апозиція (апофіза) – розширення спорангіофора, що є характерною ознакою роду *Rhizopus* [18].

На твердих поживних середовищах, таких як картопляно-декстрозний агар, пухнасті й ватоподібні колонії *R. oryzae* ZAC3 спочатку є білими, але швидко змінюють колір на сіро-коричневий або чорний через масове утворення спорангіїв, ростуть зі швидкістю 1,6 мм на годину [19].

Штам росте в аеробних та анаеробних умовах, демонструє помірну толерантність до солей, є термотолерантним і може рости в діапазоні температур від 25 °С до 45 °С, оптимальне значення рН для росту *Rhizopus oryzae* знаходиться в межах від 5.0 до 7.0 [16].

Підрозділ 2.4. Таксономічний статус біологічного агента *Rhizopus oryzae*

Положення *Rhizopus oryzae* ZAC3 у філогенетичній систематиці наведено згідно Mucobank [20]:

Домен – Eukaryota

Царство – Fungi

Відділ – Mucoromycota

Клас – Mucoromycetes

Порядок – Mucorales

Родина – Mucoraceae

Рід – *Rhizopus*

Вид – *Rhizopus oryzae*

Штам – *Rhizopus oryzae* ZAC3

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Підрозділ 3.1. Потреба у цільовому продукті

На даний час у світі досить активно досліджують вплив, дієвість та безпечність ферментних препаратів нетваринного походження. Перелічені випробування підтримуються відомими міжнародними організаціями.

Мікробні ліпази – це ферменти, що продукуються бактеріями, дріжджами та грибами. Вони здатні розщеплювати жири (ліпіди) до гліцерину та вільних жирних кислот. Завдяки їх ефективності та стабільності, ліпази широко застосовуються для біотрансформації жирів [21].

Серед ферментних препаратів нетваринного походження велику увагу приділяють саме грибковим ферментам, доля яких на ринку складає $>50\%$ [21].²³ Грибкові ФП виробляють шляхом ферментації з застосуванням таких добре відомих у харчовій промисловості грибів, як *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* та *Trichoderma* [21].

Процес виробництва й очищення грибкових ферментів визнається складним і ретельно контрольованим. Отриманні ферменти підлягають багатоступеневому очищенню, що забезпечує повне вилучення ензимів з вихідного грибкового матеріалу, а якість кінцевого продукту забезпечується шляхом його стабілізації [22].

На даний проміжок часу не достатньо всебічних даних щодо ефективності застосування вітчизняних ензимів у порівнянні з відомими закордонними аналогами. Виробництво ліпази в Україні наразі є обмеженим через складність синтезу та потребу в спеціалізованому дороговартісному обладнанні, тому наразі більша частка ліполітичних ферментів в Україні є імпортованими.

Мікробні ліпази відіграють ключову роль у сироварінні, сприяючи гідролізу жирів для формування характерного смаку сиру. Довжина ланцюгів жирних кислот у жирах впливає на смаковий профіль сиру.

НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бірюкова А. В.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк..	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					23	10
Реценз.		Пухляк А. Г.				Кафедра БТМ ²³		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Ненасичені жири з короткими ланцюгами підсилюють смакові характеристики, тоді як ненасичені жири з довгими ланцюгами можуть взагалі не мати них впливу [22].

Сир є одним із найбільш споживаних продуктів харчування, що виготовляється з молока. В процесі його виробництва традиційно застосовуються ферменти, котрі забезпечують гідроліз молочних жирів, що надає сиру унікального смаку та аромату [23].

Українські виробники активно впроваджують сучасні ферментативні технології. Розвиток біотехнологій, зокрема тих, що базуються на ферментах мікробного походження, дає змогу інтегрувати новітні наукові досягнення у харчову промисловість.

Дозрівання сиру є повільним та доволі складним процесом, який передбачає широкий спектр біохімічних процесів. Дозрівання належить до ферментативних процесів, тож підвищення активності ключових ферментів, що використовуються в цьому процесі, може бути ефективним при їх екзогенному додаванні в молоко чи сирну масу. До основних біохімічних реакцій, що впливають на формування маку сиру під час визрівання, належать гліколіз, протеоліз і ліполіз.

Основними шляхами утворення ароматичних сполук у сирі є метаболізм лактози та лактату. На першому шляху, залежно від сорту, мікрофлори та умов дозрівання, лактат може перетворюватися на різні сполуки, які сприяють формуванню смаку сиру. Другий шлях відповідає за утворення похідних жирів сполук, що утворюються в результаті реакцій ліполізу та окиснення ліпідів. Аромат сиру зумовлюється летючими сполуками, що виникають у процесі дозрівання під впливом різних ферментів [24].

Дослідники з університету Порту (Universidade do Porto) у Португалії проводили аналіз впливу використання ліпаз мікробного походження в процесі сироваріння. Метою проведення експерименту було з'ясування впливу даного ферменту при його додаванні до молока, з якого виробляли сир UF-Ras, на деякі

хімічні, реологічні та сенсорні властивості упродовж 3 місяців дозрівання. Даний сир виробляється за допомогою ультрафільтрації, характеризується повільнішим дозріванням та більш твердою текстурою у порівнянні з класичними сортами сирів [25].

Результати показали, що в дослідних сирах, до яких додавали мікробну ліпазу, рівень протеолізу й ліполізу був значно вищим у порівнянні з контрольною групою сирів, що вказало на позитивний вплив даного ферменту на процес дозрівання. Крім того, було виявлено, що ліпаза мікробного походження не впливає на валовий склад продукту.

Таким чином, внесення мікробної ліпази сприяло прискоренню процесу ліполізу приблизно на 30% протягом 60 днів. Витримані сири із додаванням даного ферменту досягли показників вмісту жирних кислот, характерних для 90-денних необроблених ліпазою сирів. Окрім того, текстура сирів, що зазнали впливу мікробного ферменту ліпази, була більш щільною порівняно з необробленими сирами аналогічного періоду витримки. Сенсорний аналіз показав значну різницю в загальній оцінці, згідно з якою контрольна група сирів характеризувалась нижчими показниками якості у порівнянні з експериментальною [25].

Далі розглянемо технологічні переваги використання ліпаз мікробного походження у процесі виробництва сирів.

Технологічні переваги використання мікробних ліпаз у сироварінні:

- Можливість отримання ферментів шляхом мікробіологічного синтезу без використання тваринної сировини;
- Стабільність ферменту у процесі виробництва;
- Зниження витрат. Зазвичай, ціна мікробних ліпаз є на 30-50% нижчою у порівнянні з тваринними аналогами;
- Підвищення якості продукції: отримання стабільних покращених смакових характеристик сирів;
- Безпечність. Ліпази мікробного походження, що використовуються в

процесі сироваріння відповідають вимогам харчової безпеки, а також мають статус GRAS (Generally Recognized as Safe), що додатково підтверджує безпечність [26].

Проаналізувавши усі дані, можна зробити висновок, що використання у процесі сироваріння ліпаз, отриманих шляхом мікробіологічного синтезу, є доволі перспективною технологією, оскільки вони мають стабільний склад та активність, є доступними та більш економічними в порівнянні з тваринними ліпазами.

Протягом останніх років довоєнного періоду в Україні діяло приблизно 200 молокопереробних підприємств, що спеціалізувались на виробництві сиру. На кінець 2022 року на ринку молочної продукції налічувалось 140 таких підприємств, що свідчить про зменшення їх кількості порівняно з 2021 роком [27].

У середньому, кожен українець споживає близько 4,66 кг сиру за рік [28].

Найбільшим виробником сиру в Україні є компанія «ТЕРРА ФУД», заснована у 1999 році. Слід зазначити, що «ТЕРРА ФУД» утримує 16,7% українського ринку сиру. У сегменті фасованої продукції її частка становить 18%. Щорічно компанія випускає близько 54000 тонн сиру.

До складу холдінгу «ТЕРРА ФУД» входять наступні підприємства [29]:

- Крижопільський сирзавод – спеціалізується на виготовленні твердих сирів; максимальна виробнича потужність сягає 37 тонн сиру та сирного продукту за добу [29];
 - Вапнярський сирзавод – один із ключових виробників твердих сирів у центральному регіоні України; добовий обсяг виробництва сиру досягає 20 тонн [29];
 - Новоодеський сирзавод – виробник твердих сирів й сирних продуктів, максимальний добовий обсяг виробництва сирного продукту якого перевищує 16 тонн [29];
 - Рожищенський сирзавод – одне з найбільших підприємств Волинської

області, де впроваджено систему управління якістю продукції (ISO 9001:2009) та систему управління безпекою харчових продуктів (ДСТУ ISO 22000:2007); максимальний денний обсяг виробництва сиру становить 19 тонн [30].

Для подальших розрахунків проаналізуємо виробництво сиру на Рожищенському сирзаводі на рік. Дане підприємство виробляє 19 тонн сиру на добу, тож на рік кількість виробленого продукту сягає близько 6935 тонн.

Кількість мікробної ліпази, що використовується для виробництва 1 кг твердого сиру, залежить від сорту сиру, технології його виготовлення та ліполітичної активності ферменту. Зазвичай, кількість ліпази коливається від 0,1 до 0,5 г на 1 кг сиру [31]. Для подальших розрахунків приймаємо кількість ліпази 0,1 г на 1 кг сиру.

$$0,1 \text{ г ліпази} - 1 \text{ кг сиру}$$

$$X \text{ г ліпази} - 6\,935\,000 \text{ кг сиру}$$

$$X = 693\,500 \text{ г}$$

Вихідні дані для розрахунку річної потреби у ліпазі наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

Підприємство	Продуктивність, т/доба	Продуктивність, т/рік	Потреба ліпази, г
Рожищенський сирзавод	19	6935	693 500

Підрозділ 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно з попередніми розрахунками (див. п. 3.1), річна потреба в ліпазі для забезпечення потреб Рожищенського сирзаводу у виробництві сирів становить 693,5 кг.

Враховуючи, що наразі в Україні жодне підприємство не займається виготовленням мікробних ліпах саме для харчової промисловості, пропонуємо в якості експерименту виробляти ліпазу для задоволення 10 % від загальної потреби Рожищенського сирзаводу. Отже, вироблятимемо ліпазу і кількості:

$$G_{\text{пл}} = 693,5 * 10 / 100 = 69,35 \text{ кг/рік}$$

Обраний біологічний агент *Rhizopus oryzae* ZAC3 на оптимізованому поживному середовищі синтезує ліпазу, ферментативна активність якої в культуральній рідині становить 31.46 Од/мл [16].

Фермент ліпаза належить до класу гідролаз, концентрація яких в культуральній рідині становить від 1,0 до 1,5 г/л [32]. Для подальших розрахунків приймаємо, що *Rhizopus oryzae* ZAC3 продукує ліпазу концентрацією 1,04 г/л в культуральній рідині.

$$0,104 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$69,35 \text{ кг} - X \text{ м}^3$$

$$X = 69,35/0,052 = 666,8 \text{ м}^3$$

З урахуванням втрат цільового продукту при виділенні (40%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 666,8 \cdot 1,4 = 933,5 \text{ м}^3$$

Підрозділ 3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення річної потреби у ліпазі (згідно п.3.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 933,5 м³ культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 330, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить: $V_{\text{д}} = V_{\text{гп}}/T_{\text{рд}} = 933,5/330 \approx 2,8 \text{ м}^3$.

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K1 * V_{\text{д}} * T_{\text{цф}})/24 = (1,1 * 2,8 * 104,5)/24 = 13,4 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (96 год) та час підготовки ферментера до роботи (8,5 год). $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера 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).

Сумарний час становить 106 годин.

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 13,4 / 0,6 = 22,3 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{\Phi} = 25 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{31} = 13,4 / 25 = 0,536$ – не перевищує заданого значення.

Підрозділ 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримують $13,4 \text{ м}^3$ культуральної рідини (див. п.1.3). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{Φ}), які становлять від 10 до 15%.

Отже, з урахуванням покриття 15% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити: $V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\Phi}) = 13400 / (1 - 0,15) \approx 15765 \text{ л}$,

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

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 15765 л. За вибраного коефіцієнта заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6 - 0,66$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера: $V_{\Phi} = 15765 / 0,6 \approx 26275 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 25000 \text{ л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення. $K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 15765 / 25000 = 0,63$

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

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_{ф}) = 15765/(1+0,1) \approx 14332$ л, де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість паосівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 15765 - 14332 = 1433 \text{ л.}$$

Для отримання 1433 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме: $V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 1433/(1-0,10) \approx 1592$ л.

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

$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 1592/(1+0,1) \approx 1447$ л, де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить :

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 1592 - 1447 = 145 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 1592$ л можна одержати під час культивування у посівному апараті: $V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 1592/0,6 \approx 2563$ л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 2500$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з2} = V_{роб.2}/V_{сф} = 1592/2500 = 0,63.$$

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

Для одержання 145 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 145/(1-0,10) \approx 161 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного

середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 161 / (1 + 0,1) \approx 146 \text{ л, де } X_{\text{ін}} = 0,1 \text{ – доза}$$

посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 161 - 146 = 15 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.3}} = 161$ л можна одержати під час культивування в інокуляторі геометричним об'ємом: $V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 161 / 0,6 = 268 \text{ л.}$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 250$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення. $K_{\text{з3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сф}} = 161 / 250 = 0,64$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Для одержання 145 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 15 / (1 - 0,10) \approx 16,6 \text{ л.}$$

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

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 16,6 / (1 + 0,1) \approx 15 \text{ л, де } X_{\text{ін}} = 0,1 \text{ – доза}$$

посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 16,6 - 15 = 1,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.4}} = 16,6$ л можна одержати під час культивування в інокуляторі геометричним об'ємом: $V_{\text{ін4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 16,6 / 0,6 \approx 28 \text{ л.}$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 25$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з4}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сф}} = 16,6 / 25 = 0,66.$$

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

Кількість інокуляту $V_{\text{пм4}} = 1,6$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап}} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме $N \text{ колб} = V_{\text{пм5}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 1600 / (750 \cdot 0,2) = 10,6 \approx 11$. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 11 качалочних колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу буде відбуватись у ферментері об'ємом 25 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у п'ять етапів (п'ятий етап сам процес виробничого біосинтезу).

Таблиця 3.2

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}}, \text{ м}^3$ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{\text{роб.}}, \text{ м}^3$ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}, \text{ м}^3$ (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{ м}^3$ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}},$ частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ст}}, \text{ м}^3$ (л)
<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
V	13,4	14,7	1,47	$\approx 14,3$	0,63	25
IV	1,47	1,62	0,162	$\approx 1,45$	0,63	2,5
III	0,161 (161 л)	0,161 (161 л)	0,018 (18 л)	0,146 (146 л)	0,64	250 л
II	18 л	19,8 л	1,6 л	15 л	0,66	25 л
I	1,6 л	1,6 л	-	1,6 л	0,2	11 колб по 750 мл

* З урахуванням $E_{\text{ф}}$

** Об'єм КР за один виробничий цикл, значення розраховано у п.1.3

Пояснення. Зміст стовпчика 3 розраховується: $V_{\text{роб.}} = V_{\text{кр}} \cdot (1 + E_{\text{ф}})$

Зміст стовпчика 4 розраховується: $V_{\text{пм}} = V_{\text{роб.}} \cdot X_{\text{ф}}$ і переноситься до стовпчика 2

наступного рядка Зміст стовпчика 5 розраховується: $V_{\text{пс}} = V_{\text{роб.}} - V_{\text{пм}}$. Зміст

стовпчика 7 спочатку розраховується, як: $V_{\text{на(ф)}} = V_{\text{роб.}} / K_{\text{зап}}$, а потім обирається

найближче значення стандартного об'єму $V_{\text{ст}}$.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Підрозділ 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю (ростовим субстратом) та енергії при вирощуванні *Rhizopus oryzae* ZAC3 є ксилоза.

У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) відсутня інформація щодо шляхів катаболізму ростового субстрату у штаму *Rhizopus oryzae* ZAC3, тому з метою побудови шляху метаболізму ксилози обираємо близькоспоріднений мікроорганізм *Aspergillus oryzae* [33].

Згідно з KEGG катаболізм ксилози у *A.oryzae* відбувається через пентозофосфатний шлях та подальшу інтеграцію продуктів у гліколіз для отримання енергії та метаболітів.

Першим етапом катаболізму ксилози у *Aspergillus oryzae* є її перетворення в ксилулозу. *A.oryzae* експресує фермент НАДФН-залежну ксилозо-редуктазу (ЕС 1.1.1.21), який перетворює D-ксилозу на ксилітол. Потім ксилітол окислюється до D-ксилулози за участю НАД⁺ - залежної ксилітолдегідрогенази (ЕС 1.1.1.9), а D-ксилулоза фосфорилується до ксилулозо-5-фосфату за рахунок дії ксилулокінази (ЕС 2.7.1.17).

Наступним етапом є включення ксилулозо-5-фосфату у пентозофосфатний шлях, де ксилулозо-5-фосфат ізомеризується до рибулозо-5-фосфату. Далі відбувається утворення рибозо-5-фосфату і седогептулозо-7-фосфату, які за участю ферментів транскетолази (ЕС 2.2.1.1) та трансальдолази (ЕС 2.2.1.2) перетворюються на гліцеральдегід-3-фосфат й фруктозо-6-фосфат.

Фруктозо-6-фосфат і гліцеральдегід-3-фосфат, отримані через пентозофосфатний шлях, включаються в гліколіз.

					НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бірюкова А. В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.				33	8
Реценз.		Пухляк А. Г.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В. П.					

Фруктозо-6-фосфат фосфорилується фосфофруктокіназою (ЕС 2.7.1.11) до фруктозо-1,6-дифосфату, який в свою чергу розщеплюється альдолазою (ЕС 4.1.2.13) на гліцеральдегід-3-фосфат і дигідроксіацетонфосфат. Далі дигідроксіацетонфосфат ізомеризується до гліцеральдегід-3-фосфату за участі триозофосфатізомерази (ЕС 5.3.1.1). Гліцеральдегід-3-фосфат окислюється та фосфорилується ферментом гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою (ЕС 1.2.1.12) до 1,3-дифосфогліцерату, що супроводжується утворенням НАДН. 1,3-дифосфогліцерат перетворюється на 3-фосфогліцерат за участі дії фосфогліцераткінази (ЕС 2.7.2.3) з утворенням АТФ. Послідовні реакції перетворюють 3-фосфогліцерат спочатку на 2-фосфогліцерат, а потім на фосфоенолпіруват. Заключним етапом гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват за участі піруваткінази (ЕС 2.7.1.40), що супроводжується другою реакцією утворення АТФ.

Нижче на рис. 4.1 наведено схему катаболізму ростового субстрату ксилози у біологічного агента *Aspergillus oryzae*.

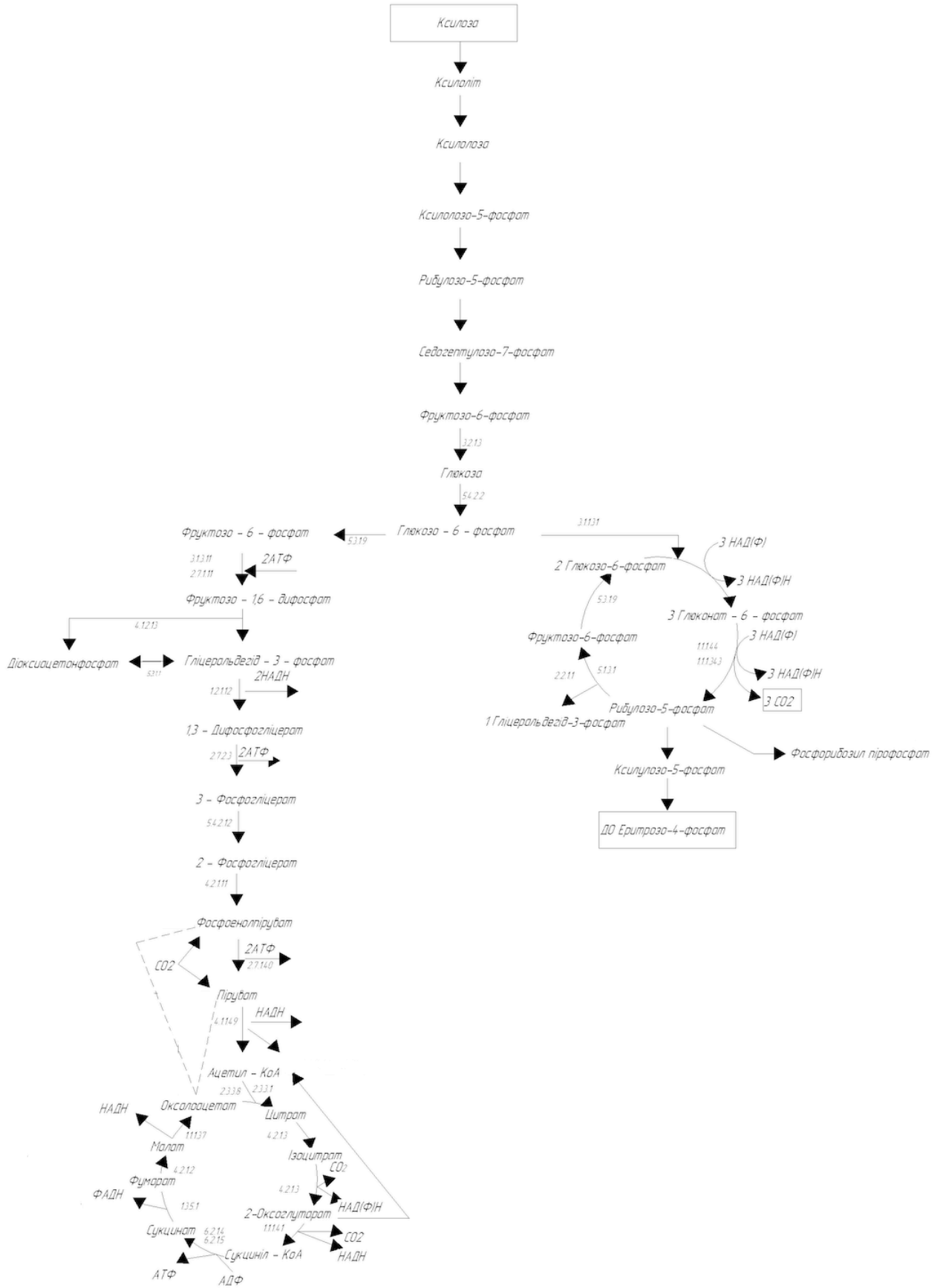


Рис. 4.1. Катаболізм ростового субстрату ксилози у біологічного агента *Aspergillus oryzae*

Ферменти:

3.2.1.3 – глюкоан 1,4-альфа-глюкозидаза; 5.4.2.2 – фосфоглюкомутаза; 3.1.1.31 – 6-фосфоглюконолактоназа; 1.1.1.44 – фосфоглюконатдегідрогеназа (декарбоксілююча); 1.1.1.343 – фосфоглюконатдегідрогеназа; 5.1.3.1 – фосфорибулоза епімераза; 2.2.1.1 – транскетолаза; 5.3.1.9 – глюкозо-6-фосфат ізомераза; 3.1.3.11 –фруктозо-1,6-бісфосфатаза; 2.7.1.11 – фосфофруко кіназа; 4.1.2.13 – фруктозодифосфат альдолаза; 5.3.1.1 – тріозофосфатізомераза; 1.2.1.12 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; 2.7.2.3 –фосфогліцераткіназа; 5.4.2.12 – фосфогліцератмутаза; 4.2.1.11 – енолаза; 2.7.1.40 – піруваткіназа; 4.1.1.49 – фосфоенолпіруват карбоксикіназа; 2.3.3.1 – цитрат оксалоацетат ліаза; 4.2.1.3 – цис-аконітаза; 1.1.1.41– ізоцитрат дегідрогеназа; 6.2.14 – сукциніл-КоА синтетаза; 6.2.15– сукцинатна тіокіназа; 1.3.5.1– сукцинатдегідрогеназа; 4.2.1.2– фумаратгідратаза; 1.1.1.37– малатдегідрогеназа; 2.3.3.6 – децилгомоцитрат синтетаза.

Підрозділ 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Rhizopus oryzae* на поживному середовищі ксилоза (джерело вуглецю) перетворюється на піруват у гліколізі. Далі піруват під дією фосфоенолпіруват карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) перетворюється на ацетил-КоА, який залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). В свою чергу, ацетил-КоА під дією цитрат-оксалоацетат-ліази (КФ 2.3.3.1) трансформується в цитрат. Дана сполука взаємодіє із аконітат гідрїтазою (КФ 4.2.1.3) і переходить у форму ізоцитрату. Ізоцитрат трансформується у 2-оксалоглутарат під дією ізоцитрат дегідратази (КФ 1.1.1.41), а потім завдяки 2-оксоглутарат редуктази (КФ 1.2.7.11) дана сполука перетворюється в сукциніл-КоА. Далі під дією сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.4) утворюється сукцинат. Під впливом фумарат редуктази (КФ 1.3.5.1) попередня сполука перетворюється на у фумарат, що надалі під дією фумарат гідратази (КФ 4.2.1.2) трансформується в малат. Потім малат завдяки малат дегідрогенази (КФ 1.1.1.37) перетворюється у оксалоацетат, амікаючи ЦТК.

Утворення амінокислот:

Як відомо, до складу фермента ліпази входить 20 амінокислот.

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспаргін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК. З оксалоацетату завдяки ацетилорнітинінамін трансферазі (КФ 2.6.1.1) утворюється **аспартат**, а аспартат під впливом аргініносукцинал-синтетази (КФ 6.3.4.5) перетворюється на **аспаргін**. З аспартату завдяки ферментам гомосерин кінази (КФ 2.7.1.39) й треонін синтаза (КФ 4.2.3.1) утворюється **треонін**, а під впливом гомосерин О-ацетилтрансферази (2.3.1.31), цистатіонової гамма-синтази (КФ 2.5.1.46), гомоцистеїн S-метилтрансферази (КФ 2.1.1.10) і гомоцистеїну метилази (КФ 2.1.1.14) аспартат перетворюється на **метіонін**. Оксалоацетат під впливом ацетогідроксикислотної дегідрогенази (КФ 4.2.1.9) та трансамінази В (КФ 2.6.1.42) перетворюється у **ізолейцин**.

Амінокислоти глютаматної родини (глутамат, глютамін, пролін, аргінін)

утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК). З 2-оксоглутарату під впливом ацетилорнітинінамін трансферази (КФ 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2) орнітинкарбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.3), аргініносукцинал-синтетази (КФ 6.3.4.5) та аргініносукцинат-ліази (КФ 4.3.2.1) утворюється **аргінін**. З 2-оксоглутарату завдяки ферменту глутамат-синтази (NADPH) (КФ: 1.4.1.14) утворюється **глутамат**. Амінокислота глутамат під дією ферменту глутамін синтетази (КФ: 6.3.1.2) перетворюється на **глутамін**. Глутамат за допомогою L-глутамат гама-полуальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.88) та пролін-5-карбоксилат дедуктази (КФ 1.5.1.2) перетворюється у **пролін**.

Гістидин: фосфорибозил трансфераза (КФ 2.4.2.17), фосфарибозил-АТФ-дифосфатаза (КФ 3.6.1.31), фосфарибозил-АМФ-циклогідролаза (КФ 3.5.4.19), 1-(5-фосфорибозил)-5-((5-фосфорибосиламіно)імідазол-4-карбоксамід ізомераза (КФ 5.3.1.16), імідазол гліцерин-фосфатна синтаза (КФ 4.3.2.10), імідазолегліцерол-фосфатдегідротатаза (КФ 4.2.1.1.19), гістидінол-фосфатна трансаміназа (КФ 2.6.1.9), дегідрогеназа алкоголю (НАДФ+) (КФ 3.1.3.15), гістидинолдегідрогеназа (КФ 1.1.1.23).

Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану. Гліцерат-3-фосфат є попередником серину, гліцину і цистеїну. Піруват – це попередник аланіну, валіну, лізину і лейцину.

З префенату утворюються **L-Фенілаланін** під дією префенатдегідратази (КФ 4.2.1.51) та **L-тирозин** під дією префенатдегідрогенази (КФ 1.3.1.13) тирозин трансамінази (КФ 2.6.1.5) й ароматичної-амінокислотної трансмінази (КФ 2.6.1.57). **L-триптофан** утворюється з антранту завдяки таким ферментам: антранілат фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18), фосфорибозилантранілат-ізомераза (КФ 5.3.1.24), індол-3-гліцерин-фосфатна синтаза (КФ 4.1.1.46) та триптофан-синтаза (КФ 4.2.1.20).

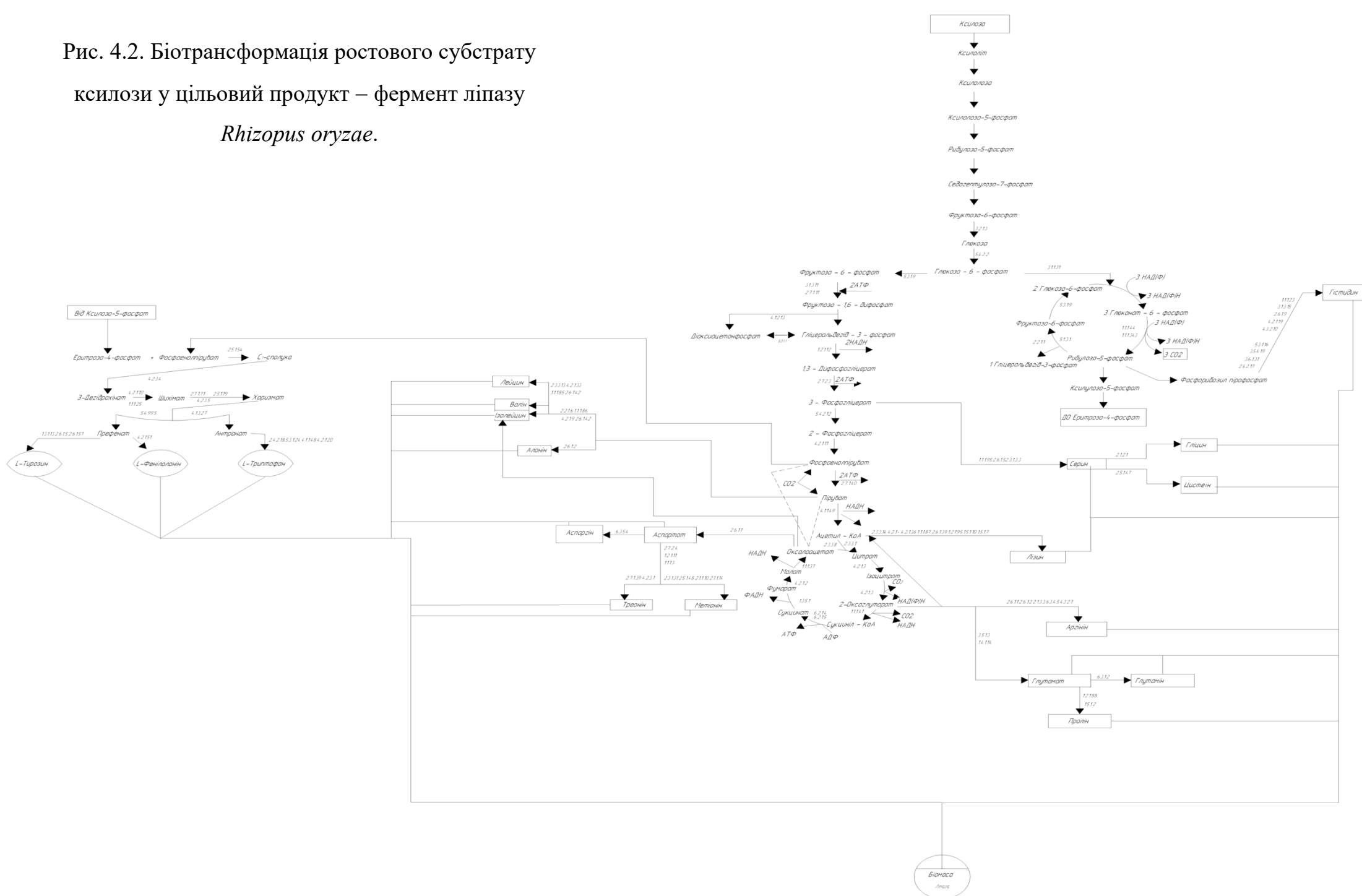
Піруват утворюється з фосфоенолпірувату (фермент піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)). **Аланін** утворюється завдяки аланін трансамінази (КФ 2.6.1.2), **валін** – завдяки ацетолактатній синтетазі (КФ 2.2.1.6) та

дигідроксиізовалератдегідрогеназі (КФ 1.1.1.86). **Лейцин:** 2-ізопропілмалат синтаза (КФ 2.3.3.13), ізопропілмалатдегідратаза (КФ 4.2.1.33), 3-ізопропілмалат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.85), трансаміназа В (КФ 2.6.1.42). В свою чергу, піруват завдяки таким ферментам, як гомоцитратсинтетаза (КФ 2.3.3.14), гомоаконітаза й гомоаконітатгідратаза (КФ 4.2.1-4.2.1.36), гомоізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.87), 2-аміноадипаттрансаміназа (КФ 2.6.1.39), L-2-аміноадипатредуктаза (КФ 1.2.1.95), а також сахаропінредуктаза (КФ 1.5.1.10) та сахаропіндегідрогеназа (КФ 1.5.1.7) перетворюється на **лізин**.

З 3-фосфогліцерату завдяки таким ферментам, як фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95), фосфосерин трансаміназа (КФ 2.6.1.52) та фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3) утворюється **серин**, який в свою чергу під дією гліцин-гідроксиметилтрансферази (КФ 2.1.2.1) перетворюється на **гліцин**, а під дією цистеїн-синтази (КФ 2.5.1.47) – у **цистеїн**.

Нижче на рис. 4.2 наведено схему біотрансформації ростового субстрату ксилози у цільовий продукт – фермент ліпазу *Rhizopus oryzae*.

Рис. 4.2. Біотрансформація ростового субстрату ксилози у цільовий продукт – фермент ліпазу *Rhizopus oryzae*.



РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Підрозділ 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування продуцента *Rhizopus oryzae* ZAC3 будемо здійснювати глибинним способом, адже він має низку переваг у порівнянні з поверхневим через можливість суттєвого зменшення виробничих територій та виключення виснажливої непродуктивної ручної праці. Слід зазначити, що даний метод гарантує асептичні умови, що є критично важливим моментом через фізіолого-біохімічні особливості обраного біологічного агента, який є мезофілом (потребує аерації). Крім того, завдяки глибинному методу культивування є змога спрощення механізації й автоматизації виробництва [34].

Як відомо, найвищий синтез фермента ліпази відбувається в експотенційній фазі росту. Це означає, що вибір безперервного способу культивування продуцента є недоцільним, тому з метою досягнення максимального біосинтезу ліпази обираємо періодичний спосіб культивування *R. oryzae* ZAC3. Враховуючи той факт, що обраний біологічний агент є аеробом, необхідно забезпечити доступ кисню до поживного середовища всередині ферментера, тому апарат повинен бути оснащений аераційною та перемішувальною системами.

Отже, культивування продуцента ліпази, *Rhizopus oryzae* ZAC3, виконують глибинним періодичним способом з дотриманням усіх правил асептики, а також із використанням перемішувальної та аераційної систем.

Rhizopus oryzae належить до міцеліальних грибів, тому для виключення ймовірності пошкодження міцелію під час процесу культивування слід правильно підібрати ферментер.

Як було згадано вище, ферментер повинен бути оснащений системою барботажу повітря у поєднанні з ефективним перемішуванням для максимального розчинення кисню в поживному середовищі.

НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бірюкова А. В.			РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк..	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					41	21
Реценз.		Пухляк А. Г.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Для перемішування обираємо турбінну мішалку. Конструкція мішалок цього типу сприяє створенню потужних та керованих потоків, що позитивно впливає на розповсюдження поживних речовин, кисню, а також запобігає осіданню біомаси. Цей процес, у свою чергу, забезпечує більш однорідний рост міцелію, збільшує швидкість масообміну і, як наслідок, веде до кращої ефективності процесу ферментації. Задля подачі гарячої та холодної води для підтримання необхідної температури культивування, ферментер має бути оснащений рубашкою.

Використовувати механічний або хімічний спосіб піногасіння недоцільно, оскільки в поживному середовищі присутня оливкова олія, що володіє піногасними властивостями. Отже, у встановленні механічних піногасників чи в додаванні піногасних речовин немає потреби.

Ферментер також має бути оснащений датчиками температури (для підтримки її на рівні 45°C), зондом рН (5.0), рівень якого регулюється додаванням 15%-го розчину NaOH та 15%-го HCl, датчиком концентрації розчиненого кисню, датчиком для контролю швидкості перемішування, що забезпечують технологічний контроль процесу біосинтезу. Це забезпечить стабільність процесу та дозволить оптимізувати умови для максимального виходу ліпази.

Отже, для культивування штаму *Rhizopus oryzae* ZAC3 обираємо ферментер з системою перемішування за допомогою турбінної мішалки, обладнаний рубашкою, барботером, датчиками для контролю ключових параметрів (розчинений кисень, температура, рівень рН).

Підрозділ 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Rhizopus oryzae ZAC3 є облигатним аеробом, тож процес ферментації потребує постійної подачі стерильного повітря через барботер, через це одним з ключових завдань є забезпечення великого обсягу стерильного повітря для аерації.

Підготовку посівного матеріалу та інокуляту здійснюють у приміщенні лабораторії та мікробіологічному боксі, тому повітря в цих приміщеннях стерилізують із використанням УФ-ламп, які виконують ультрафіолетове випромінювання.

Підготовка стерильного стисненого повітря для біореакторів виконується наступним чином:

- Атмосферне повітря забирається турбокомпресором через вхідну шахту, розташовану на висоті 5 метри від найвищої точки будівлі. Це робиться з причини, що зі збільшенням висоти над землею концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується.

- З метою видалення пилу та механічних часточок повітря очищують з використанням фільтрів попереднього очищення.

- Для створення необхідного тиску, аби подолати опір фільтрувальних матеріалів на подальших етапах фільтрування, а також аби подолати гідравлічний опір під час диспергування повітря в об'ємі культуральної рідини, повітря піддається стисненню в турбокомпресорі до 0,35-0,5 МПа. Варто зазначити, що стиснення повітря в компресорі спричиняє підвищення його до температури 200°C та збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму.

- Для охолодження нагрітого стисканням повітря та видалення з нього вологи використовується водяний теплообмінник.

- З метою остаточного осушення повітря від конденсату та вирівнювання тиску, його подають у ресивер.

- Для очищення повітря, призначеного для всіх ферментерів цеху, від мікроорганізмів використовують головні фільтри, що наповнені набивним волокном. Вони розташовуються в цеху ферментації на основному колекторі стисненого аераційного повітря.

- Очищення на індивідуальних фільтрах передбачає надходження повітря

через колектори від головних фільтрів. Ці фільтри встановлюються безпосередньо на кожному ферментері та забезпечують затримання 99,9999% мікроорганізмів.

Підрозділ 5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Використання мийно-дезінфікуючих засобів дозволяє підтримувати виробничі приміщення, інвентар, поверхні обладнання й оснащення в належному санітарному стані, а також сприяє дотриманню особистої гігієни персоналом і попередженню поширення збудників захворювань.

Для забезпечення асептичності процесу культивування продуцента *Rhizopus oryzae* ZAC3 спершу виконується миття й дезінфекція обладнання, що використовується. До мийних і дезінфікуючих засобів висуваються такі вимоги: широкий спектр протимікробної активності, бактерицидна дія щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, добра розчинність у воді, легке змивання при споліскуванні, відсутність подразнюючої дії на шкіру, стійкість при зберіганні, слабка корозійна активність, відсутність неприємного запаху й безбарвність, швидка дія й довга тривалість дії, пожежо- і вибухобезпечність, за токсикологічною характеристикою мають відноситись до нетоксичних чи малотоксичних [35].

Для обробки виробничих приміщень, зовнішніх частин комунікацій розглянемо такі мийно-дезінфікуючі засоби, як «Данаклін 3Д», «Інструцид-НАТА (Instrucide – NATA)» та «BALU Профі-Дез». Слід зазначити, що усі представлені засоби мають чинну реєстрацію у Державному реєстрі дезінфекційних засобів України та дозволені для використання на підприємствах фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, мікробіологічної та парфюмерно-косметологічної промисловості.

«Данаклін 3Д» – це універсальний засіб для профілактичної дезінфекції та одночасного миття поверхонь в приміщеннях, санітарно-технічного обладнання, проведення генеральних прибирань, достерилізаційного очищення виробів

медичного призначення, тож це дозволяє використовувати «Данаклін 3Д» для миття обладнання, стін, підлоги та устаткування [36].

Переваги засобу «Данаклін 3Д»: виготовлений на основі ЧАС та гуанідину; містить в своєму складі мийний та антикорозійний комплекси; має освіжаючий запах; характеризується широким спектром антимікробної активності; не містить окислювачів; добре змішується з водою в будь-яких співвідношеннях; є не горючим [36].

«Інструцид-НАТА» – універсальний комбінований безальдегідний засіб, робочі розчини якого володіють миючими, дезодоруючими, змочувальними, емульгуючими властивостями, а також не залишають нальоту, липкої плівки, і плям на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці, видаляють механічні, білкові та жирові забруднення. Робочими розчинами засобу дозволено обробляти об'єкти з будь-яких матеріалів [37].

Переваги засобу «Інструцид-НАТА»: засіб має виражені миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі властивості; володіє бактерицидною, туберкулоцидною, віруліцидною, фунгіцидною, спороцидною дією; добре видаляє механічні, білкові, жирові забруднення; дозволяє проводити якісну дезінфекцію при мінімальних концентраціях. За параметрами гострої токсичності згідно з ГОСТ 12.1.007-76 відноситься до 3 класу небезпеки (помірно небезпечна речовина) [37].

Засіб дезінфекційний з миючим ефектом «БАЛУ® ПРОФІ ДЕЗ» – універсальний концентрований засіб призначений для миття та дезінфекції водостійких покриттів, зокрема підлоги, кахлю, пластикових та інших видів поверхонь. Відмінно видаляє різні види органічних забруднень, не залишає розводів та підходить для щоденного використання [38].

Переваги засобу «БАЛУ® ПРОФІ ДЕЗ»: поєднує миття та дезінфекцію в одному засобі; підходить для миття та дезінфекції водостійких поверхонь, таких як підлога, кахель, пластик та інші; забезпечує чистоту поверхонь та залишає свіжий аромат; не залишає розводів; концентрована формула забезпечує

економічне використання; розроблений для професійного використання, що гарантує високу якість [38].

Для очищення ферментаційного обладнання від залишків культуральної рідини проаналізуємо засоби «Віндез НОК» та «Даноксин». Слід зазначити, що усі представлені засоби мають чинну реєстрацію у Державному реєстрі дезінфекційних засобів України та дозволені для використання на підприємствах фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, мікробіологічної та парфюмерно-косметологічної промисловості.

«Віндез НОК» – швидкодіючий дезінфікуючий засіб широкого спектру дії на основі 15% надоцтової кислоти та перекису водню [39].

До основних властивостей та переваг засобу «Віндез НОК» слід віднести: широкий спектр антимікробної дії, ефективність при низьких концентраціях та температурах, безпечність до навколишнього середовища, універсальність застосування, не потребує змивання, добре сумісний з різними матеріалами, володіє хорошими миючими та дезодоруючими властивостями [39].

«Даноксин» – це концентрований дезінфікуючий засіб у вигляді порошку білого кольору, що виготовлений на основі перкарбонату натрію (50-55%) та тетраацетилетилендіаміну (ТАЕД) – 18-25%. Застосовується для дезінфекції різноманітних поверхонь, дезінфекції високого рівня (ДВР), передстерилізаційного очищення та стерилізації медичних виробів та інструментів [40].

Переваги засобу «Даноксин»: має широкий спектр антимікробної дії; робочі розчини володіють добрими змочувальними, очищуючими, миючими, емульгуючими, знежирюючими та дезодоруючими властивостями, ефективно видаляють органічні та неорганічні забруднення; легко змивається, не залишаючи нальоту та плям; сумісний з більшістю матеріалами; не фіксує органічні забруднення; характеризується низьким піноутворенням; є безпечним для довкілля [40].

Для обробки шкіри рук та шкірних покривів персоналу обираємо такі

дезінфікуючі засоби, як «БіоСепт» та «Стеридол», що мають широкий спектр антимікробної дії та характеризуються пролонгованою у часі протимікробною дією. Обрані засоби не виявляють шкірно-подразнюючих та сенсibiliзуючих властивостей при одно- та багаторазовому нанесенні на шкіру, а також не мають кумулятивних властивостей і специфічних віддалених ефектів (мутагенного, ембріотоксичного, гонадотропного і канцерогенного) [41, 42].

Гігієнічна антисептика шкіри рук виконується шляхом нанесення 3 мл засобу «Стеридол» або «BioSept» на сухі руки з подальшим втиранням в шкіру до висихання, час обробки у відповідності до прийнятого алгоритму гігієнічної антисептики рук - 30 сек [41, 42].

Нижче наведено узагальнюючу таблицю характеристики мийно-дезінфікувальних засобів (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
Засоби для обробки стін, підлоги, вікон та дверей								
«Данаклін 3Д» (Виробник ТОВ «ДАНА МЕДКАЛ», Україна)	C12-14 Алкїлдиметилбензил амоній хлорид 4,5%-5,5%, полі (гексаметилен) гуанідину гідрохлорид 0,3%-0,5%)	Бактерії, віруси, гриби, спори	Концентрат для дезінфекції та миття поверхонь, дезінфекції та передстерилізаційного очищення медичних виробів. На основі ЧАС та гуандинину, вміщує мийний комплекс; Не містить окислювачів, добре змішується з водою; Робочі розчини мають гарні миючі, дезодоруючі, емульгуючі властивості.	Не чинить шкідливої дії на матеріали оброблюваних об'єктів, виготовлених з металів (в т. ч. алюмінію), скла, полімерних матеріалів, гуми, не пошкоджує лакофарбове і гальванічне покриття.	Застосовується у вигляді водних робочих розчинів різних концентрацій, залежно від мети дезінфекції та оброблюваних об'єктів. Способи обробки: ручний, механізований.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру засобів 2023 року за №1649. Дата внесення: 19.09.2023 року. Термін дії до: 19.09.2028 року	1 л коштує 309 грн	[36]
«Инструцид-НАТА (Instrucide – NATA)» (Виробник ТОВ "НАТА ГРУП", Україна)	20,0 N,N-біс(Замінопропіл)до дециламіну; 14,0 дидецилдиметиламоній хлориду, інгібітори корозії, вода підготовлена – 100 %.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Універсальний комбінований безальдегідний засіб для поточної, заключної, профілактичної дезінфекції всіх типів поверхонь, для проведення генеральних прибирань, для знезараження медичних виробів (дезінфекція + достерилізаційне очищення + стерилізація, дезінфекція високого рівня). Робочі розчини володіють миючими, дезодоруючими, змочувальними, емульгуючими властивостями.	Не чинить шкідливої дії на матеріали оброблюваних об'єктів, виготовлених з металів (в т. ч. алюмінію), скла, полімерних матеріалів, гуми, не пошкоджує лакофарбове і гальванічне покриття.	Застосовується у вигляді водних робочих розчинів різних концентрацій, залежно від мети дезінфекції та оброблюваних об'єктів. Способи обробки: ручний, механізований.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру засобів 2021 року за №2637. Дата внесення: 26.11.2021 року. Термін дії до: 26.11.2026 року	5 л коштують 1960 грн	[37]
«Balu ПРОФІ ДЕЗ» (Виробник ТОВ «ПРОФІ-ДЕЗ», Україна)	Діюча речовина: 2-феноксіетанол 0,5-2,5 %; допоміжні речовини: аніонні ПАВ від 15 до 30 %, неіоногенні ПАВ менш як 5 %, амфотерні ПАВ менш як 5 %, ялицева олія, вода підготовлена до 100 %	Бактерії, віруси, гриби, спори	Слаболужний концентрований засіб, призначений для миття та дезінфекції водостійких покриттів, зокрема підлоги, кахлю, пластикових та інших видів поверхонь. Відмінно видаляє різні види органічних забруднень, забезпечує бездоганну чистоту та свіжий аромат, не залишає розводів, підходить для щоденного використання.	Не ушкоджує поверхні будь-яких матеріалів (пластмаси, метали, лакофарбові покриття, тканини, скла, штучні покриття та дерева), обладнання, інструменти та шкірні покриви. Не залишає розводів та не викликає алергічних реакцій.	Залежно від ступеню та виду забруднення розчинити 200-500 мл засобу у 10 л води. Способи обробки: ручний, механізований.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру засобів 2023 року за №1707. Дата внесення: 29.09.2023 року. Термін дії до: 29.09.2028 року	5 л коштують 638 грн	[38]
Засоби для миття та дезінфекції обладнання								
«Даноксин» (Виробник «ДАНА МЕДКАЛ», Україна)	Діючі речовини: перкарбонат натрію 50%-55%, тетраацетилетиленді	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб у вигляді порошку для дезінфекції різноманітних поверхонь, дезінфекції високого рівня (ДВР), передстерилізаційного очищення та стерилізації медичних виробів та	Засіб в робочих концентраціях не ушкоджує матеріали, поверхні із нержавіючої сталі, алюмінію і його сплави,	Застосовується у вигляді водних робочих розчинів різних концентрацій (від 0,05 до 2,0%),	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за	5 кг коштують 3525 грн	[40]

	амін (ТАЕД) – 18-25%		інструментів. Робочі розчини мають гарні змочувальні, очищаючі, мийні, емульгуючі, знежирюючі та дезодоруючі властивості; не залишають нальоту і плям на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці; гомогенізують мокротиння, інші біорідини, виділення.	вироби зі скла, гуми, каучуків, полімерних матеріалів, штучної шкіри, кахлю, порцеляни та інших матеріалів.	залежно від мети дезінфекції та оброблюваних об'єктів. Способи обробки: ручний, механізований.	№971. Дата внесення: 19.08.2020 року. Термін дії до: 19.08.2025 року			
<i>«Вінdez НОК» (Виробник «Санітарний щит України», Україна)</i>	Діючі речовини: надоцтова кислота ≤ 15%, пероксид водню ≤ 25%, оцтова кислота ≤ 30%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Високоєфективний рідкий концентрований безпінний дезінфекційний засіб для дезінфекції та миття. Стеріокс добре змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Робочі розчини прозорі, мають помірний запах оцтової кислоти, мають мийні властивості, видаляють механічні, білкові, жирові забруднення; не фіксують органічні забруднення.	Робочі розчини не чинять шкідливої дії на об'єкти, виготовлені з нержавіючої сталі (в т. ч. хромової, хромонікелевої, аустенітної), луженого заліза, алюмінію, скла, гуми (в т. ч. силіконової), кислотостійких пластмас (в т. ч. поліетилен, поліпропілен, полівінілхлорид).	Застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації 0,005-0,01%. Способи обробки: Ручний (протирання, занурення, замочування, заповнення), механізований; циркуляційний (в т. ч. в СІР-системах), аерозольний.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1649. Дата внесення: 19.09.2023 року. Термін дії до: 19.09.2028 року	20 л коштують 2160 грн	[39]	
Засоби для обробки шкіри рук персоналу									
<i>Засіб дезінфікуючий для обробки рук і шкіри «БіоСепт» («BioSept»)</i>	Спирт етиловий 75%; екстракт Aloe VERA 0,4%; олія жожоба 0,1%; парфумерна композиція 0,1%; алкілдиметилбензіламоніум хлорид (чорничні амонієві сполуки) 0,5%; вода очищена	Бактерії, віруси, гриби	ВІОsept призначений для гігієнічного оброблення шкіри рук і гарантованого знищення вірусів (включно з збудниками COVID-19, гепатитів А і В, грипу, ГРВІ, аденовірусів, ротавірусів та інші), бактерій (вибудників туберкульозу, стійких штамів стафілококів, ентеробактерій, синегнову паличку та інші), грибкових інфекцій (кандиди, дерматофітоми, цвілі).	ВІОsept належить до 4 класу безпечних речовин. Не викликає алергії та подразнень шкіри у разі тривалого використання.	Для гігієнічної дезінфекції рук застосовувати не менш ніж 3 мл засобу, втирати в суху шкіру рук 30 с	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2019 року за №270. Дата внесення: 10.02.2022 року. Термін дії до: 10.02.2027 року	5 л коштують 430 грн	[41]	
<i>Засіб дезінфікуючий для обробки рук і шкіри «Стеридол»</i>	2-пропанол (спирт ізопропиловий) – 60,0% - 65,0%, алкіл(C12 -C16) диметилбензіламоніум хлорид 0,08% - 0,1%	Бактерії, віруси, гриби	Стеридол – спиртовий антисептик для гігієнічної та хірургічної обробки рук та шкірних покривів. Містить антиоксиданти, складові по догляду за руками; Не пересушує та не подразнює шкіру; Мас пролонговану у часі протимікробну дію - до 5 годин.	Засіб «Стеридол» за параметрами гострої токсичності належить до мало небезпечних речовин (4 клас небезпеки, відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007). Не виявляє шкірно-подразнюючих та сенсibiliзуючих властивостей при одно- та багаторазовому нанесенні на шкіру.	Для гігієнічної дезінфекції рук застосовувати не менш ніж 3 мл засобу, втирати в суху шкіру рук 30 с	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2022 року за №332. Дата внесення: 17.02.2022 року. Термін дії до: 17.07.2027 року	5 л коштують 945 грн	[42]	

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво ліпази *Rhizopus oryzae* ZAC3 здійснюється упродовж 330 днів і передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 25 м³, інокулятори об'ємами 2.5 м³, 250 л та 25 л, а також збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, бокс та лабораторне устаткування.

Виробництво здійснюється в таких приміщеннях: цех виробничого біосинтезу, лабораторне приміщення для проведення різноманітних операцій, де знаходяться автоклави, бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю.

На рис. 2.1 наведено приблизний план приміщення для виробництва ліпази речовин *R. oryzae* ZAC3. План враховує діаметри обладнання та відстань між апаратами (не менше 1 м) і від стін (1...1,5 м).

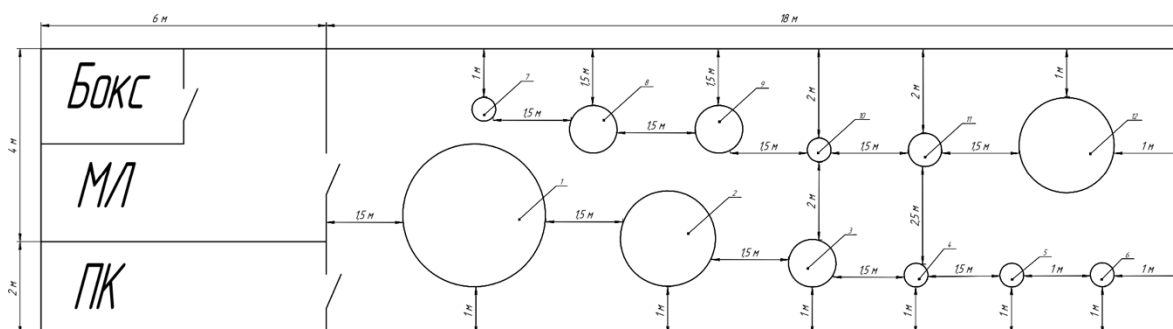


Рис. 5.1. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва ліпази *Rhizopus oryzae* ZAC3. (А – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту (1 – ферментер об'ємом 25 м³, 2 – інокулятор (І-36) об'ємом 2500 л, 3 – інокулятор (І-34) об'ємом 250 л, 4 – інокулятор (І-32) об'ємом 25 л, 5 – установка безперервної стерилізації (УБС-29), 6 – реактор-змішувач (РЗ -12) для приготування та стерилізації композиції А, 7 – збірник-змішувач (ЗЗ-14) для приготування композиції Б, 8 – реактор-змішувач (РЗ – 17) для приготування та стерилізації композиції А, 9 – збірник-змішувач (ЗЗ-20) для приготування композиції Б, 10 – збірник для зберігання оливкової олії (З-28), 11– реактор-змішувач (РЗ – 23) для приготування та стерилізації композиції А, 12 – збірник-змішувач (ЗЗ-26) для приготування композиції Б.

За ширину будівлі ми приймаємо найближче стандартне значення – 24 м. Довжину будівлі приймаємо кратну довжині стандартних будівельних плит, тобто 6 м. Габаритні розміри основного обладнання наведено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва ліпази *R. oryzae* ZAC3

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	25000	3	8,5
Емність для приготування розчину для установки безперервної стерилізації	15000	2,12	4,24
Збірник для зберігання оливкової олії	200	0,6	1,1
Інокулятор	2500	1,8	1,8
Збірник-змішувач для приготування композиції Б	1100	1,1	1,4
Збірник-змішувач для приготування композиції А	600	0,85	1,1
Інокулятор	250	1,75	1,96
Збірник-змішувач для приготування композиції Б	100	0,7	1,5
Збірник-змішувач для приготування композиції А	60	0,4	0,5
Інокулятор	25	0,35	0,5
Збірник-змішувач для приготування композиції Б	12,5	0,4	0,575
Збірник-змішувач для приготування композиції А	5	0,48	1,5
Всього:	44852,5		

Згідно даним табл. 5.2, загальний об'єм реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить **44,8525 м³**.

З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня, тобто 330 разів. Один раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (обробка стін, підлоги, вікон тощо), тобто 10 разів на 330 днів. Для

розрахунку кількості мийних засобів необхідно розрахувати приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 108 м^2 ($18 \times 6 \text{ м}$), площа стін – $((18 + 6) \times 2) \times 48 = 120 \text{ м}^2$, загальна площа – $108 + 120 = 228 \text{ м}^2$. Загальну площу поверхні обробки мийними засобами наведено у табл. 5.3.

Табл. 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м^2	Площа стін, м^2	Загальна площа, м^2
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	108	120	228
Мікробіологічна лабораторія	24	50	74
Приміщення з качалками	12	40	52
Загальна площа	144	210	354

Кількість виробничих циклів для одержання ліпази становить 69. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 70 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$44,8525 \times 70 = 3139,675 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період виробництва ліпази *Rhizopus oryzae* ZAC3

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м^2 (м^3)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м^2 (м^3)
Обладнання	44,852	70	$3139,675 \text{ м}^3$
Підлога	144	330	47520
Стіни, двері, вікна	210	10	2100

Загальна площа підлоги становить 144 м². Підлога має піддаватися обробці кожного робочого дня. Кількість трудоднів – 330, тож миття підлоги за весь період виробництва повинно здійснюватись 330 разів. Загальна площа миття та дезінфекції підлоги за весь час складає:

$$144 \times 330 = 47520 \text{ м}^2.$$

Площа вікон, стін та дверей дорівнює 210 м². Дані об'єкти слід обробляти 1 рази на місяць, тобто кількість процесів обробки за 330 днів складатиме 10 разів. Отже, загальна площа миття даних об'єктів за весь період виробництва становитиме $210 \times 10 = 2100 \text{ м}^2$.

Для миття ємнісного обладнання використовується СІР-мийки. Витрати робочого розчину складають 20-30% від об'єму обладнання що миється, приймемо витрати на рівні у межах 20%. Отже, для миття та дезінфекції 3139,675 м³ обладнання необхідно витратити:

$$3139,675 \times 0,2 = 627,935 \text{ м}^3 \text{ засобу в рік}$$

Дані щодо вибору мийних та дезінфікуючих засобів доцільніше наводити у вигляді узагальнюючої таблиці 5.5. Під час вибору мийних та дезінфікуючих засобів необхідно зважати на їх ефективність і вартість, а також на витрати для обробки потрібної площі/об'єму. Зазвичай, для обробки 1 м² поверхні витрачається 100 мл розчину.

Таблиця 5.5

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва ліпази

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Даноксин	Обладнання	0,25	3139,675	627935	705	1,7625	1106735,44
Віндез НОК	Обладнання	0,1	3139,675	627935	108	0,108	67816,98
Данаклін 3Д	Поверхні обладнання, приміщень	0,2	3189,295	797324	309	0,618	492746,23
Інструцид-НАТА	Поверхні обладнання, приміщень	0,1	3189,295	797324	392	0,392	312551
Валу ПРОФІ-ДЕЗ	Поверхні обладнання, приміщень	0,25	3189,295	797324	127,6	0,319	254346,36
Засіб дезінфікуючий для обробки рук і шкіри «БіоСепт» («BioSept»)	Обробка шкіри	Готовий до використання	-	-	86	-	-
Засіб дезінфікуючий для обробки рук і шкіри «Стеридол»	Обробка шкіри	Готовий до використання	-	-	189	-	-

Підрозділ 5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу ліпази *R. oryzae* використовується середовище наступного складу (г/л) [16]:

- Дріжджовий екстракт – 10;
- Ксилоза– 10;
- NaCl – 0.5;
- CaCl₂·2H₂O – 0.5;
- Оливкова олія – 1% (об'єна частка).

Згідно зі здійсненими в розділі 3 розрахунками, виробничий біосинтез ліпази проводять у ферментері об'ємом 25 м³, що містить 14,3 м³ поживного середовища. Інокулят отримують у чотири етапи: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 25 л, 250 л та 2,5 м³.

Стерилізації підлягають усі компоненти, окрім оливкової олії. Оливкова олія, як і інші рослинні олії, зазвичай не потребує стерилізації перед додаванням до поживного середовища. Це пояснюється тим, що олії мають низький вміст води, що створює несприятливі умови для росту більшості мікроорганізмів, знижуючи ризик контамінації [43]. Таким чином, додаткової стерилізації оливкова олія не потребує, тому вона вноситься до вже стерильного поживного середовища.

5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (1,6 л).

Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: дріжджовий екстракт та ксилоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0.05 МПа).

Композиція Б: NaCl та CaCl₂·2H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 50 хв, 0.15 МПа).

Дріжджовий екстракт та ксилоза є термолабільними компонентами і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі NaCl та CaCl₂·2H₂O стерилізують окремо при стандартній для солей температурі. Оливкова олія є індуктором та вноситься після стерилізації всіх інших компонентів.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 5.6:

Таблиця 5.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,6 л (1600 мл) середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Дріжджовий екстракт	10	16 г	А	282
Кслоза	10	16 г		
Вода	250 мл			
NaCl	0,5	0,8 г	Б	1302
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	0,8 г		
Вода	1300,4 мл			
Оливкова олія	10	16 мл	-	16
Разом:				1600 мл (1,6 л)

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

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 25 л

Для цієї стадії необхідно 15 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.4.1.

Стерилізація композиції А буде відбувається в окремому реакторі-

змішувачі. Композицію Б готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації). Оливова олія подається в інокулятор після стерилізації всіх інших компонентів.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 25 л наведений у табл. 5.7:

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 15 л (15000 мл) середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Дріжджовий екстракт	10	150 г	А	4000
Ксилоза	10	150 г		
Вода		3300 мл		
Конденсат		400 мл		
NaCl	0,5	7,5 г	Б	10850
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	7,5 г		
Вода		9750 мл		
Конденсат		1085 мл		
Оливова олія	10	150 мл	-	150
Разом:				15000 мл (15 л)

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 250 л

Для цієї стадії необхідно 146 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.1.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 250 л наведений нижче у табл. 5.8:

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 250 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 146 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	10	1460 г	Закінчення табл. 5.8 А	50
Ксилоза	10	1460 г		
Вода	42,08 л			
Конденсат	5 л			
NaCl	0,5	73 г	Б	94,54
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	73 г		
Вода	84,94 л			
Конденсат	9,45 л			
Оливкова олія	10	1460 мл	-	1,46
Разом:				146 л

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 2,5 м³

Для цієї стадії необхідно 1,45 м³ поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.4.1.

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2,5 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1450 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	10	14,5 кг	А	485,5
Ксилоза	10	14,5 кг		
Вода	407,95 л			
Конденсат	48,55 л			
NaCl	0,5	0,725 кг	Б	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	0,725 кг		
Вода	853,55 л			
Конденсат	95 л			
Оливкова олія	10	14,5 л	-	14,5
Разом:				1450 л

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 25 м³

Для цієї стадії необхідно 14,3 м³ поживного середовища. Такий об'єм поживного середовища економічно доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. Це дозволить зменшити витрати води, пари та скоротити час обробки поживного середовища. Обираємо УБС-15 з продуктивністю 15 м³/год (час стерилізації становитиме 30 хв.). Температура стерилізації – 131 °С.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 25 м³ наведений у табл. 5.10:

Таблиця 5.10

Склад композиції для стерилізації поживного середовища в УБС

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 14,3 м ³ середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	10	143 кг	А	14157
Ксилоза	10	143 кг		
NaCl	0,5	7,15 кг		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	7,15 кг		
Вода	12441 л			
Конденсат	1415,7 л			
Оливкова олія	10	143 л	-	143
Разом:				14300 л

5.5.1 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Для підтримки оптимального рівня рН=5.0 під час біосинтезу ліпази, що є вторинним метаболітом, готуємо два титрувальні агенти – 15%-й розчин NaOH та 15%-й розчин HCl.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 15 %, об'ємом 30 мл) для інокулятора об'ємом 25 л:

$$0,36x = 0,15 \times 30$$

$$0,36x = 4,5$$

$$x = 12,5 \text{ мл (36\% - ї HCl)}$$

Розрахунок кількості питної води необхідної для приготування 30 мл 15 % HCl для інокулятора об'ємом 25 л: $30 - 12,5 = 17,5$ мл.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 15 %, об'ємом 292 мл) для інокулятора об'ємом 250 л:

$$0,36x = 0,15 \times 292$$

$$0,36x = 43,8$$

$$x \approx 121,7 \text{ мл (36\% - ї HCl)}$$

Розрахунок кількості питної води необхідної для приготування 292 мл 15% HCl для інокулятора об'ємом 250 л: $292 - 121,7 = 170,3$ мл.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 15 %, об'ємом 2900 мл) для інокулятора об'ємом 2500 л:

$$0,36x = 0,15 \times 2900$$

$$0,36x = 435$$

$$x \approx 1208 \text{ мл (36\% - ї HCl)}$$

Розрахунок кількості питної води необхідної для приготування 2900 мл 15% HCl для інокулятора об'ємом 2500 л: $2900 - 1208 = 1692$ мл.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 15 %, об'ємом 28600 мл) для ферментера об'ємом 25 м³:

$$0,36x = 0,15 \times 28600$$

$$0,36x = 4290$$

$$x \approx 11916,7 \text{ мл (36\% - ї HCl)}$$

Розрахунок кількості питної води необхідної для приготування 28600 мл 15% HCl для ферментера об'ємом 25 м³: $28600 - 11916,7 = 16683,3$ мл.

Для корегування рН необхідно також приготувати 15%-й розчин NaOH з розрахунку 2 мл/л культуральної рідини.

Розрахунок кількості NaOH для приготування титрувального агента

концентрацією 15% для інокулятора об'ємом 25 л:

$m(\text{NaOH}) = (30 \times 15) / 100 = 4,5 \text{ г}$ (потрібно для приготування 15 % NaOH об'ємом 30 мл)

Розрахунок кількості NaOH для приготування титрувального агента концентрацією 15% для інокулятора об'ємом 250 л:

$m(\text{NaOH}) = (292 \times 15) / 100 = 43,8 \text{ г}$ (потрібно для приготування 15 % NaOH об'ємом 292 мл)

Розрахунок кількості NaOH для приготування титрувального агента концентрацією 15% для інокулятора об'ємом 2500 л:

$m(\text{NaOH}) = (2900 \times 15) / 100 = 435 \text{ г}$ (потрібно для приготування 15 % NaOH об'ємом 2900 мл)

Розрахунок кількості NaOH для приготування титрувального агента концентрацією 15% для ферментера об'ємом 25 м³:

$m(\text{NaOH}) = (28600 \times 15) / 100 = 4290 \text{ г}$ (потрібно для приготування 15 % NaOH об'ємом 28600 мл)

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведено в табл.6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ліпази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозбірник	1	Повітрозбірник АІИ 017.000-01. Фірма: «ВекторКондвент». Обладнаний металевою сіткою, що слугує для видалення механічних забруднень. Робочий тиск: до 0,6 МПа (6 кг*с/см ²) та до 1,2 МПа (12 кг*с/см ²). Габаритні розміри (мм): висота 219, ширина 602, довжина 398 [1].
ФГО-2	Фільтр грубої очистки повітря	2	Повітряний фільтр ФВКАС-6. Виробник: «Єврофільтр». Фільтрувальний матеріал: пенополіуретан; продуктивність: 3400 м ³ /год; Е=80%; габаритні розміри, мм: 592х592х48 [2].
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор Т2 («Dalgakiran»). Продуктивність: 2250 м ³ /год; робочий тиск: 5.5 – 8.8 бар; габаритні розміри, мм: 2450х1640х1900 [3].
ТО-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий осушувач повітря («Hankison») рефрижераторного типу. Продуктивність: 1700 м ³ /год; робочий тиск: до 16 атмосфер; габарити, мм: 390х344х320; потужність: 5,7 кВт [4].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний РВ 500.15.00. Об'єм, л: 500; максимальний робочий тиск: 15 бар; габаритні розміри, мм: висота - 1800, ширина - 700, довжина - 650. Виробник: «BARRENS» (Німеччина) [5].
ТН-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Паровий калорифер (нагрівач). Матеріал труб: нержавіюча сталь. Теплоносій: водяна пара Макс. робоча температура: 400°С. Тиск робочого середовища: 10, 16, 25 бар. Виробник: ОПЕКС [6].

НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Бірюкова А. В.		
Перевір.		Воронцов О. О.		
Реценз.		Пухляк А. Г.		
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В. П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Аркушів
			62	6
Кафедра БТМ				

Продовження табл. 6.1

Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки повітря. Клас очистки: F8. Фільтруючий матеріал: мікростекловолокно. Продуктивність 2480 м ³ /год. Е=99,92%. Габаритні розміри(мм) : 592x490x292. Виробник: компанія «Технофільтр» (Україна) [7].
РЗ-12	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Хімічний реактор-змішувач об'ємом 5 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 316L; оснащений сорочкою, температурним датчиком, мішалкою зі швидкістю перемішування 0-460 об/хв; потужність, Вт: 120; габаритні розміри, мм: 450 x 480 x 1500. Виробник: «BEIFAN» (Китай) [8].
ЗЗ-14	Збірник-змішувач для приготування композиції Б	1	Хімічний реактор об'ємом 12,5 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 304L; оснащений сорочкою, температурним датчиком, нагрівальними елементами, мішалкою - 35 об/хв; тиск - 2 атм. Розміри: діаметр 400 мм × висота 575 мм. Маса (без мотор-редуктора): 26 кг. Робоча температура: до 80 °С. Виробник: «WiseMaster» (Україна) [9].
ОВД-13 ОВД-15 ОВД-18 ОВД-21 ОВД-24 ОВД-27 ОВД-30	Об'ємно-ваговий дозатор	7	Дозатор ваговий автоматичний «Art Mash» (Україна). Мінімальна межа дозування – 1 кг, максимальна – 50 кг. Продуктивність: 800-1200 кг/год. Розміри: 870*870*2100 мм; дискретність відліку 0.005 г; вага, кг: 170 [10].
Ф-33 Ф-35 Ф-37 Ф-39	Індивідуальний фільтр очистки повітря	4	Фільтр повітряний сепараторний типу «Лаік» Д 3/26 . Пропускна здатність – 2800 м ³ /год. Площа фільтра – 26 м ² . Фільтруючий матеріал - ультратонкі перхлорвінілові волокна зі стійким статичним зарядом, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999 %. Габаритні розміри(мм): висота 636, ширина 590, довжина 485. Виробник: «Техно Град» (Україна) [11].
ІН-32	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 40 л «OLLITAL Technology» (Китай). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з регульованою швидкістю перемішування: 50-1000 об/хв; із датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури, манометром. Габаритні розміри, мм: 1000×800×1200. Вага, кг: близько 160 [12].
			Хімічний реактор-змішувач об'ємом 60 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI

РЗ-17	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	316L; оснащений сорочкою, температурним датчиком, мішалкою 50-400 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,55 кВт; габаритні розміри, мм: 1320 x 830 x 1660. Виробник: «Промвіт» (Україна) [13].
ЗЗ-20	Збірник-змішувач для приготування композиції Б	1	Хімічний реактор-змішувач об'ємом 100 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 316L; оснащений сорочкою, температурним датчиком, мішалкою: 0-150 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,55 кВт; габаритні розміри, мм: 700 x 700 x 1500; маса, кг: 300. Виробник: «STS Group» (Україна) [14].
ІН-34	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 250 л «STS Group» (Україна). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, якорну мішалку з частотою обертання 93.3 об/хв; потужність якорної мішалки зі скребками та піногасником, кВт: 1,5; із датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури, манометром. Габаритні розміри, мм: 1050 x 1050 x 1600; маса, кг: 350 [17].
РЗ-23	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Хімічний реактор-змішувач об'ємом 600 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 316L; оснащений сорочкою, температурним датчиком, мішалкою. Виготовлення на замовлення. Габаритні розміри: Діаметр: приблизно 900–1000 мм; Висота: приблизно 1500–1800 мм (без урахування мотор-редуктора та опор). Виробник: «STS Group» (Україна) [19].
ЗЗ-26	Збірник-змішувач для приготування композиції Б	1	Хімічний реактор-змішувач об'ємом 1100 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 316L. Виготовлення на замовлення. Виробник: «Corginox Srl» (Італія). Максимальний робочий тиск: 0,5 МПа. Температурний діапазон: до +100 °С. Габаритні розміри: залежно від конструкції, орієнтовно 1400 × 1400 × 2400 мм. Маса: близько 700 кг [20].
ІН-31	Насос перистильчастий	1	Насос перистильчастий серії TF-RM продуктивністю від 0,6 до 14,4 м ³ /год. Максимальна в'язкість: 150000. Температура до 100 °С. Тиск: до 2 бар. Матеріал: алюмінієві сплави. Виробник: «Speroni» (Італія) [22].
ІН-36	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 3200 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з регульованою швидкістю перемішування; потужність двигуна

Закінчення табл. 6.1

			мішалки: 1,5 кВт; габаритні розміри, м: 1,8 x 1,8. Виробник: «Steridose» (Швейцарія) [23].
УБС-29	Установка безперервної стерилізації	1	Хімічний реактор об'ємом 15 м ³ , виготовлений із нержавіючої сталі AISI 316L; оснащений якірною мішалкою з нагрівальними елементами, охолоджувальною сорочкою. Робочий тиск: до 0,3 МПа (можливість виготовлення під тиск або вакуум). Робоча температура: до 200 °С. Габаритні розміри: Діаметр корпусу: приблизно 2000–2500 мм; Загальна висота: приблизно 4000–5000 мм. Виготовлення на замовлення. Виробник: «Hubei Dong Runze Special Vehicle Equipment Co., Ltd.» (Китай) [24]. Матеріал (теплообмінників): нержавіюча сталь; потужність – 15 м ³ /год; температура стерилізації – 131 °С; містить 2 теплообмінника. Виготовлення на замовлення.
НВ-9 НВ-11 НВ-11' НВ-16 НВ-19 НВ-22 НВ-25 НВ-28 НВ-40	Насос відцентровий	9	Циркуляційний насос Grundfos. Насос відцентровий герметичний, матеріал чугун. Продуктивність від 3,2 м ³ /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія [Насос Grundfos UPS [Електронний ресурс] //Режим доступу: https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyy-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html].
ФР-38	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 25 м ³ «WUXI ZHANGHUA PHARMACEUTICAL EQUIPMENT CO., LTD.» (Китай). Матеріал: нержавіюча сталь 304. Габарити (Д × Ш × В): не більше 3,6 × 2,9 × 2,2 м. Маса: не більше 3,5 т. Додаткове обладнання: Мішалка: лопатева з регулюванням висоти; Барботер: для аерації; Система контролю: датчики температури, рН, тиску; Люки: смотрові та посівні; Клапани: дискові, мембранного типу, з можливістю ручного або автоматичного керування. Виготовлення на замовлення [27].
ЗЗ-28	Збірник-змішувач для зберігання оливкової олії	1	Ємність технологічна з мішалкою для зберігання рідин з герметичним люком та краном для зливу об'ємом 200 л з нержавіючої сталі AISI 316. Габаритні розміри, мм: 560 x 1100. Маса, кг: 23,9. Виробник: ТОВ «ВК Енергопром» (Україна) [28].

Примітка: 1 - http://euromash.kiev.ua/ua/vozduhozborniki_ua.php ; 2 - <https://ventfilter.kiev.ua/ru/goods/filtr-vozdushniy-karmanniy-fvk-4734918/> ; 3 - <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-t2/> ; 4 - <https://dalgakiran.ua/uk/products/promyslovi-osushuvachi-povitrya-hankison-refryzheratornogo-typu/> ; 5 - https://letiss.com.ua/ua/receivers/rv_500_15_00_ua?srsltid=AfmBOoq_BluQ9FA_kl0FnaX8QMIMeg-HyWeNCPQ4FiPX2NsYwkgnucq4 ; 6 - <https://vents-shop.com.ua/vodyanoy-nagrevatel-nkv-400h200-2/> ; 7 - <https://ventfilter.kiev.ua/ru/goods/kassetnye-filtry-dlya-ochistki-vozduha-klass-filtratsii-f8-4734857/> ; 8 - <https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html> ; 9 - <https://wisemaster.com/reaktori/reaktor-laboratornij-125-l-tisk-2-atm-aisi-304> ; 10 - <https://artmash.ua/product/dozator-sypuchih-materialov-06-kub-m> ; 11 - https://ukrvent.com/like_filter-html/ ; 12 - https://www.ollital.com/40l-60l-80l-lined-stainless-steel-chemical-reactor_p696.html#parentHorizontalTab021 ; 13 - <https://promvit.com.ua/reaktor-fermenter-z-magnitnoyu-mishalkoyu-rf-60/> ; 14 - <https://stprom.com.ua/ua/p1720299542-reaktor-rubashkoj-meshalkoj.html> ; 15 - <https://www.dozator.com.ua/products/dozator-vesovoj-avtomaticheskij-dlya-dozirovaniya-zhidkosti> ; 16 - https://ru.made-in-china.com/co_thenow-filter/product_Mini-Pleat-ULPA-Filter-Panels-U15-U16-U17-for-Cleanrooms_ensoyrrsg.html ; 17 - https://stprom.com.ua/ua/p1719804126-himicheskij-reaktor-250.html?srsltid=AfmBOor89Hd315hmF0FQyOmmfnM4sz5sVPH65SNVZo4wMxiZwfaSzs_Z ; 18 - <https://sweda.com.ua/produksiya/ruchnoi-dozator/> ; 19 - <https://stprom.com.ua/ua/p1016493586-reaktor-600-litrov.html?srsltid=AfmBOopSTEWYiAVqQOFLyj1Zl8ITbi6K3gd0gagbTF3LTIxG1PciNmwe> ; 20 - <https://www.coprinox.it/en/listings/513647-1100-liter-olsa-reactor-mixer> ; 21 - https://agrovektor.com/physical_product/358521-dozator-vesovoy-sypuchih-materialov-ad-2000-2bsch.html ; 22 - <https://watton.ua/speroni-nasos-tf->

1000-

s.html?srsltid=AfmBOooV1uXooAvUBm8_zapGgI99Xq3Mo75mkz_ErHt8gmwrf-Fp_YUS; 23 - <https://www.foeth.com/en/chemical/detergent-surf/steridose-3200-ltr-stainless-steel-reactor-015z089/> ; 24 - <https://tictrucks.en.made-in-china.com/product/wOETeFPHAgRw/China-Customizing-Steel-Lined-PE-15-25m3-Acid-Alkali-Mixing-Neutralization-Surge-Chemical-Surge-Vessel-Stirring-Tank-Reactor.html> ; 25 - <https://profimann.com.ua/uk/nasosy-i-nasosnye-stancii/poverhnosnye-nasosy/monoblochnyy-centrobezhnyy-nasos-speroni-cs-50-160-d/> ; 26 - <https://tapflo.ua/ru/products/diaphragm/pe-ptfe-series-pumps/t100-1> ; 27 - <https://wuxizhanghua.en.made-in-china.com/product/sSoJrylMNpc/China-30L-32000L-Pressure-Vessel-Stainless-Steel-Jacketed-Reactor-Cstr-Reactor.html>; 28 - <https://energoprom.in.ua/ua/p709736928-yemnist-tehnologichna-dlya.html>.

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу ліпази штамом *Rhizopus oryzae* ZAC3 включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за через забірну шахту, що розташована на 5 м висотою від даху будинку, де концентрація мікроорганізмів є стабілізованою, атмосферне повітря буде забиратись турбокомпресором. Для видалення забруднень повітрязабірник ПЗ-1, що обладнаний металевою сіткою.

ДР 1.2. Очищення від пилу і механічних часточок

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю $E = 80\%$, затримуються частинки діаметром більше 50 мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 200 °С, тиск становить 0,35-0,5 МПа.

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) до температури 25-40 °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Ре-5), де усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 50-70%.

					НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бірюкова А. В.			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк..	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					68	10
Реценз.		Пухляк А. Г.				68		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В. П.						

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Нагрівання повітря з метою стабілізації показників (тиску, температури) здійснюють на пластинчастому теплообміннику-нагрівачі (Т-6), повітря нагрівається до температури 60 °С.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-7). Ступінь очищення – 99,92 %.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Остаточне очищення повітря здійснюють в індивідуальних фільтрах (ІФ-8, ІФ- 13, ІФ-21) з фільтрувальним матеріалом – скловолокном. Ступінь очищення повітря $E = 99,9999$ %.

ДР 2. Зважування та зберігання оливкової олії

ДР 2.1. Зберігання оливкової олії для подальших виробничих етапів

Необхідний об'єм оливкової олії за допомогою дозатора завантажують у попередньо простерилізований збірник, додаткової стерилізації оливкова олія не потребує. Необхідну кількість оливкової олії відбираємо на кожен виробничий етап.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація титрувального агенту HCl 15% для інокулятора 25 л

Приготування кислоти відбувається у скляній колбі на 50 мл. Туди додають 12,5 мл кислоти та 17,5 мл питної води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація титрувального агенту HCl 15% для інокулятора 250 л

Приготування кислоти відбувається у скляній колбі на 250 мл. Туди додають 121,7 мл кислоти та 170,3 мл питної води та перемішують. Закривають колбу

ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація титрувального агенту HCl 15% для інокулятора 2500 л

Приготування кислоти відбувається у скляному бутлі на 4000 мл. Туди додають 1208 мл кислоти та 1692 мл питної води та перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація титрувального агенту HCl 15% для ферментера 25 м³

Приготування кислоти відбувається у реакторі-змішувачі об'ємом 50 л. Туди додають 11916,7 мл кислоти та 16683,3 мл питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізація відбувається при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація титрувального агенту NaOH 15% для інокулятора 25 л

На технічних вагах зважують 4,5 г NaOH. Наважку поміщають у колбу об'ємом 50 мл, і додають 30 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3.6. Приготування та стерилізація титрувального агенту NaOH 15% для інокулятора 250 л

На технічних вагах зважують 43,8 г NaOH. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, і додають 292 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3.7. Приготування та стерилізація титрувального агенту NaOH 15% для інокулятора 2500 л

На технічних вагах зважують 435 г NaOH. Наважку поміщають у бутль об'ємом 4000 мл, і додають 2900 мл питної води, перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 3.8. Приготування та стерилізація титрувального агенту NaOH 15% для ферментера 25 м³

Приготування титранту відбувається у реакторі – змішувачі (РЗ-10) на 50 л. На технічних вагах зважують 4290 г NaOH і додають 28600 мл водопровідної води, вмикають перемішувальний пристрій. Стерилізація відбувається шляхом подачі пари в сорочку апарата, при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічні ваги встановлюють та відтаровують чистий скляний стакан об'ємом 100 мл, відважують у ньому 16 г ксилози. Таким же чином у новому стакані відважують 16 г дріжджового екстракту. Наважки вносять у чисту колбу об'ємом 0,5 л. За допомогою мірного циліндра відміряють 250 мл водопровідної води, додають у колбу із компонентами, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію проводять в автоклаві при 112°С (0,5 атм) упродовж 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,8 г NaCl та 0,8 г CaCl₂·2H₂O. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1300,4 мл водопровідної води та перемішують до розчинення солей. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°С (1,5 атм) упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. Змішування композицій

До колби з композицією Б (від ДР 4.1.2) стерильно вносять композицію А (від ДР 4.1.1) та 16 мл оливкової олії, перемішують. Після охолодження поживне середовище розподіляють на 11 колб (V = 750 мл, Кз. ≈ 0,2).

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 25 л

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-13) відважують 150 г дріжджового екстракту та 150 г ксилози. Наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-12) об'ємом 5 л, подають 3300 мл води та перемішують. Стерилізацію проводять подачею гострої пари за температури 112°C (0,5 атм) упродовж 30 хв.

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-15) зважують 7,5 г NaCl та 7,5 г CaCl₂·2H₂O. Наважки переносять у збірник-змішувач (ЗЗ-14) об'ємом 12,5 л, подають 9750 мл води, перемішують до розчинення при нагріванні. Розчин за допомогою насоса (НВ-16) подають до інокулятора (ІН-32) і стерилізують композицію за температури 131°C (40 хв).

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 250 л

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-18) зважують 1460 г дріжджового екстракту та 1460 г ксилози. Наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-37) об'ємом 60 л, подають 42,08 л води та вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізацію проводять подачею гострої пари за температури 112°C (0,5 атм) упродовж 30 хв.

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-21) зважують 73 г NaCl та 73 г CaCl₂·2H₂O. Наважки переносять у збірник-змішувач (ЗЗ-20) об'ємом 100 л, подають 84,94 л води, перемішують до розчинення солей при нагріванні. Розчин

подають насосом відцентровим (НВ-22) в інокулятор (ІН-34), який попередньо простерилізовано, і стерилізують копозицію за температури 131°C (40 хв).

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 2500 л

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-24) зважують 14,5 кг дріжджового екстракту та 14,5 кг ксилози. Наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 600 л (РЗ-23), подають 407,95 л води та вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізацію проводять безпосередньо в збірнику подачею гострої пари за температури 112°C (0,5 атм) упродовж 30 хв.

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-27) зважують 725 г NaCl та 725 г CaCl₂·2H₂O. Наважки переносять у збірник-змішувач (ЗЗ-26) об'ємом 1100 л, подають 854 л води, вмикають перемішуючий пристрій до розчинення солей при нагріванні. Розчин насосом (Н-28) перекачують в інокулятор (ІН-36), який попередньо простерилізовано, і стерилізують копозицію за температури 131°C (40 хв).

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого ферментера 25 м³

ДР 4.5.1. Приготування композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (системи УБС-29) зважують 143 кг дріжджового екстракту, 143 кг ксилози, 7.15 кг NaCl та 7.15 кг CaCl₂·2H₂O. Підготовлені компоненти поміщають в реактор УБС об'ємом 15 м³, додають 12441 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та проводять суспендування компонентів упродовж 5-10 хвилин.

Підготовлене нестерильне поживне середовище відцентровим насосом

подається в установку безперервної стерилізації УБС-15.

ДР 4.5.2. Стерилізація композиції А в УБС

Середовище з реактора УБС перекачується за допомогою центрального відцентрового насоса у колонку швидкісного нагріву, де нагрівається паром до температури стерилізації, потім поступає у теплообмінник-витримувач, де витримується за температури 131°C упродовж 10 хв. Далі поживне середовище поступає у теплообмінник-рекуператор. Свіжі порції нестерильного поживного середовища поступають у теплообмінник-рекуператор, завдяки чому відбувається нагрівання нестерильного поживного середовища та охолодження стерильного. Для кінцевого охолодження поживне середовище надходить у теплообмінник, де охолоджується до температури культивування 45 °С. Після цього стерильне та охоложене середовище подається насосом у ферментер (ФР-38).

ТП 5. Підготовка поживного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Rhizopus oryzae* зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (трибутириновий агар) за температури 2-4 °С з пересівом 1 раз на 2 – 3 місяці на свіже поживне середовище. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *Rhizopus oryzae* ZAC3 розсівають на чашки Петрі, що містять 2% w/v трибутиринового агару (пептон 5 г/л, дріжджовий екстракт 3 г/л, агар 12 г/л), для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 37 °С (96 год).

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізольовані колонії *R. oryzae* із чашок Петрі (від ТП 5.2) пересівають

голкою у пробірки зі скошеним трибутириновим агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування становить 96 годин, а температура – 45°C.

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Поживне середовище (від ДР 4.1.3) розливають по 150 мл у стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. Коефіцієнт заповнення качалочних колб становить $K_{\text{зап}} = 0,2$.

У пробірку з робочою культурою *Rhizopus oryzae* (від ТП 5.2) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію спор і переносять у колбу Ерленмейера. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву 1 колби використовують суспензію, одержану з 1 пробірки. Культивують на качалках (150 об/хв) при температурі 45°C упродовж 48 год. Здійснюють ехнологічний контроль обертів качалки та температури.

Мікробіологічний контроль, відсутність сторонньої мікробіоти.

За допомогою засівного балона переносять до ТП 5.5.

ТП 5.5 Вирощування в інокуляторі 25 л

У попередно простерилізований інокулятор зі стерильними композиціями А (від ДР 4.2.1) та Б (від ДР 4.2.2) в асептичних умовах додають 150 мл оливкової олії, вмикають перемішувачий пристрій. Через засівний стакан подають посівний матеріал (від ТП 5.4). Температура культивування становить 45 °С, рН = 5.0. Регулювання рН здійснюють за допомогою титрувальних розчинів (від ДР 3.1 та ДР 3.5) шляхом автоматизованої системи контролю. Швидкість перемішування - 60-80 об/хв при рівні аерації ($O_2 = 1 \text{ л/л} \times \text{хв}$). Тривалість культивування складає 48 годин.

Кожні 6 годин з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю для перевірки відсутності сторонньої мікробіоти та визначення концентрації біомаси.

ТП 5.6 Вирощування в інокуляторі 250 л

У попередньо простерилізований інокулятор, що містить 94,54 л простерилізованого розчину композиції Б (від ДР 4.3.2), після охолодження середовища в асептичних умовах подають 50 л розчину композиції А (від ДР 4.3.1). Далі через автоматизований лічильник відміряють 1460 мл оливкової олії, в асептичних умовах подають в інокулятор з стерильним поживним середовищем. Додаткової стерилізації оливкова олія не потребує.

Після цього в інокулятор передають посівний матеріал (через трубу перетискування (від ТП 5.5)). Температура культивування становить 45 °С, рН = 5.0. Регулювання рН здійснюють за допомогою титрувальних розчинів (від ДР 3.2 та ДР 3.6) шляхом автоматизованої системи контролю. Швидкість перемішування - 60-80 об/хв при рівні аерації ($O_2=1$ л/л×хв). Тривалість культивування складає 48 годин.

Кожні 6 годин з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю для перевірки відсутності сторонньої мікробіоти та визначення концентрації біомаси.

ТП 5.7. Вирощування в інокуляторі 2,5 м³

У попередньо простерилізований інокулятор, що містить 950 л простерилізованого розчину композиції Б (від ДР 4.3.2), після охолодження середовища в асептичних умовах подають 485,5 л розчину композиції А (від ДР 4.3.1). Далі через автоматизований лічильник відміряють 14,5 л оливкової олії, в асептичних умовах подають в інокулятор з стерильним поживним середовищем. Додаткової стерилізації оливкова олія не потребує.

Після цього в інокулятор передають посівний матеріал (через трубу перетискування (від ТП 5.6)). Температура культивування становить 45 °С, рН = 5.0. Регулювання рН здійснюють за допомогою титрувальних розчинів (від ДР 3.3 та ДР 3.7) шляхом автоматизованої системи контролю. Швидкість перемішування - 60-80 об/хв при рівні аерації ($O_2=1$ л/л×хв). Тривалість культивування складає 48 годин.

Кожні 6 годин з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю для перевірки відсутності сторонньої

мікробіоти та визначення концентрації біомаси.

ТП. 6. Біосинтез

ТП. 6.1 Виробниче культивування

Після охолодження стерильне поживне середовище з УБС (від ДР 4.5.2) в асептичних умовах передається безпосередньо в виробничий ферментер (ФР-38) Далі через автоматизований лічильник відміряють 142 мл оливкової олії, в асептичних умовах подають до ферментера з стерильним поживним середовищем. Додаткової стерилізації оливкова олія не потребує. Культивування здійснюють при температурі 45 °С упродовж 96 годин. Швидкість перемішування становить 150 об/хв при рівні аерації ($O_2=1$ л/лхв). Регулювання рН здійснюють за допомогою титрувальних розчинів (від ДР 3.4 та ДР 3.8) шляхом автоматизованої системи контролю.

Кожні 6 годин з ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю для перевірки відсутності сторонньої мікробіоти та визначення ферментативної активності ліпази.

Накопичення максимальної активності ферменту ліпази при культивуванні *Rhizopus oryzae* ZAC3 відбувається в стаціонарній фазі росту. Ліполітична активність повинна сягати 31.46 Од/мл в культуральній рідині, після чого культивування припиняють.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Ліпази, що виробляються *Rhizopus oryzae*, являють собою екстрацелюлярні ферменти, тобто секретуються біологічним агентом у поживне середовище.

Це полегшує виділення ферменту, адже для його отримання немає потреби в руйнуванні клітин продуцента. Процедура очищення зазвичай спирається на відмінності у фізико-біохімічних властивостях ліпаз від інших білків та складових поживного середовища (розмір, заряд, гідрофобність) [44].

Виділення та очищення ліпаз – це процес, що вимагає значних зусиль та часу. З огляду на це, ферментні препарати іноді застосовують у неочищеному вигляді. Наприклад, у шкіряній та хутряній промиловостях рівень очищення не впливає на кінцеву якість виробів. Водночас, у харчовій промисловості, виробництві мікробіологічних препаратів, та особливо в медицині, допускається використання лише ферментів із достатньо високим, часом навіть граничним, ступенем очищення [14].

Ефективне застосування мікробної ліпази в сироварінні передбачає обов'язкове ретельне очищення ферменту. Це забезпечує його високу активність та безпеку для продуктів харчування.

Для використання ліпази в сироварінні, де потрібна висока чистота, проте не завжди потрібна надзвичайно висока гомогенність, можливо оптимізувати процес очищення за допомогою двофазних водних систем (АТРС). Нижче наведено детальну характеристику основних етапів виділення та очищення ліпази.

1. Ферментація та збір культуральної рідини. Культуральну рідину після процесу виробничого біосинтезу за допомогою перистальтичного насоса подають у збірник, де відбувається зберігання за температури 4 °С до початку стадій виділення та очищення.

					НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бірюкова А. В.			РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Перевір.		Воронцов О. О.					
Реценз.		Пухляк А. Г.					
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В. П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						78	4
					78 Кафедра БТМ		

2. Відділення біомаси. Першим кроком у виділенні з культуральної рідини ліпази, що синтезована штамом *Rhizopus oryzae* ZAC3, є підготовка культурального супернатанту. Після завершення ферментації клітини продуцента потрібно відокремити від культуральної рідини.

Біомаса грибів *Rhizopus* зазвичай має досить велику щільність і розміри клітин, а центрифугування дозволяє ефективно осаджувати її. Також слід додати, що культуральна рідина з даним біологічним агентом часто має високу в'язкість через виділення полісахаридів, що ускладнює процес фільтрації, тож центрифугування в таких умовах є найоптимальнішим методом [44].

2.1. Центрифугування. У роботі [45] з метою відділення біомаси *Rhizopus* використовували метод центрифугування. Культуральну рідину піддавали центрифугуванню при 1000 об/хв упродовж 15 хвилин при температурі 4 °С. Слід зазначити, що завдяки такому обраному температурному режиму мінімізується денатурація ферменту та запобігається ріст контамінуючих мікроорганізмів. Далі супернатант, що являє собою сирий ферментний екстракт, збирають для подальшої обробки [45].

3. Концентрування супернатанту

3.1. Ультрафільтрація. Ультрафільтрація застосовується в якості ефективного методу концентрування білків та видалення низькомолекулярних домішок на ранніх етапах очищення ферменту. Даний спосіб базується на різниці розмірів молекул та проводиться із використанням напівпроникних мембран. Ультрафільтрацію виконують задля зменшення об'єму надосадової рідини та концентрування ліпази для подальших стадій очищення.

Автори статті [46] використовували ультрафільтраційний модуль «Millipore Pellicon-2» з мембраною «Biotech» 10 кДа. При цьому усі молекули, що мають молекулярну масу менше 10 кілодальтон проходять через мембрану, а ліпаза й інші білки, молекулярна маса яких є більшою за 10 кДа, залишаються у ретентаті.

Готують 50 мМ фосфатного буфера (рН=7.0) із додаванням 0.1 мМ CaCl₂.

Перед тим, як розпочати роботу, проводять промивання усієї системи й мембрани спочатку дистильованою водою, а потім ще й декількома об'ємами свіжого буфера. До резервуару ультрафільтраційної установки подають культуральний фільтрат, встановлюють температуру – 4 °С та тиск на рівні 1-2 бар.

4. Очищення з використанням двофазної водної системи. Цей процес є основним етапом очищення, який замінює іонообмінну та гель-фільтраційну хроматографію, забезпечуючи таким чином розділення ліпази від інших білків. Перевагами використання даного методу є збереження активності ферменту завдяки м'яким умовам виконання процесу, висока селективність та екологічність (адже використання водних розчинів замість різноманітних органічних розчинників зменшує вплив на навколишню середовище) [47].

Двофазні водні системи утворюються шляхом змішування двох несумісних водних розчинів, наприклад, полімеру (поліетиленгліколь, ПЕГ) та солі (фосфат калію), що в свою чергу призводить до формування двох окремих фаз. Таким чином, ліпаза розподіляється в одну фазу, а домішки залишаються в іншій [46].

До фільтрату, тобто сирого розчину ліпази, додають розчини ПЕГ 4000 (18 мас. %) та фосфату калію (15 мас. %) та інтенсивно перемішують отриману суміш упродовж 10 хвилин для забезпечення повного змішування та формування фаз. Далі суміш ще залишають на 30 хвилин для повного розділення фаз. Ліпаза *Rhizopus oryzae* розподіляється у верхню фазу, яка збагачена ПЕГ. Після повного розділення верхня (полімерна) фаза, що містить очищену ліпазу, відділяється від нижньої за допомогою ділильної воронки або промислового сепаратора [46].

5. Доочищення

5.1. Діаліз верхньої фази. Проводиться за допомогою використання діалізного мішка з певним порогом відсікання молекулярної маси, що дозволяє пройти солям через пори, а білку – залишитися всередині.

Діаліз виконують проти 50 мМ фосфатного буфера при рН=7.0 через мембрану 10-14 кДа з метою видалення ПЕГ та солей, змінюючи буфер 4 рази раз на 4 години при температурі 4 °С [46].

6. Сушіння

6.1. Сушіння в розпилювальній сушарці. Аби виконати переведення очищеної ліпази з рідкої форми в суху стабільну для можливості тривалого зберігання, виконують сушіння ферментного препарату ліпази в розпилювальній сушарці.

Концентрат подають на розпилюючий пристрій з частотою обертання 11000 об/хв. Гаряче повітря при цьому надходить через повітрерозподілюючу голівку. Здійснюють сушіння за температури теплоносія 100 °С на вході в сушарку до досягнення стабільної вологості кінцевого продукту (4,2-7,0 %). Температура на виході відпрацьованого повітря повинна становити 70 °С, а температура сухого препарату – не більше 45 °С [48]. Сухі часточки відділяються від повітря за допомогою циклону, де осаджуються під впливом дії відцентрової сили.

Після закінчення процесу сушіння фермент ліпаза має вигляд порошку, тому не потребує подрібнення та просіювання.

7. Фасування

Готовий сухий ферментний препарат упаковують в герметичну та вологонепроникну тару з нанесенням відповідного маркування.

8. Зберігання

Отриманий продукт зберігають за температури 4 °С у темному та сухому місці. Слід зазначити, що за описаних умов зберігання ліпаза зберігає до 95 % активності протягом 6-12 місяців.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Підрозділ 9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюють прямим мікроскопіюванням та розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами.

Для здійснення мікробіологічного контролю застосовують експрес метод – пряме мікроскопіювання. Цей метод виконують з використанням світлового мікроскопа, для чого готують препарат «роздавлена крапля». Приготування препарату «роздавлена крапля» виконується на попередньо знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини. Потім його накривають накривним скельцем таким чином, аби під ним не залишалось пухирців повітря, і мікроскопіюють з об'єктивом 40x [49].

Підрозділ 9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Концентрація біомаси

Визначення концентрації біомаси *Rhizopus oryzae* ZAC3 виконують ваговим методом.

Визначення концентрації біомаси складається із трьох послідовних реакцій: 1 – доведення маси фільтрів до постійного значення, 2 – відокремлення клітин мікроорганізму від культуральної рідини, 3 – визначення їх маси.

Зазвичай визначають масу сухих клітин. Біомасу виражають у грамах або міліграмах на літр культуральної рідини.

Обладнання та матеріали: 1) чашки Петрі з культурою мікроорганізмів, 2) культуральна рідина з певною концентрацією мікроорганізму, 3) фільтри, 4) чашки Петрі, 5) аналітичні ваги, 6) сушильна шафа, 7) ексікатор.

Хід роботи:

Спочатку здійснюється доведення маси фільтрів до постійного значення. Для цього фільтри, попередньо покладені у відкриту чашку Петрі, розміщують у сушильну шафу й висушують при температурі 80-85°C протягом 1-2 год.

НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бірюкова А. В.			РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					82	5
Реценз.		Пухляк А. Г.				Кафедра БТМ 82		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Потім чашку Петрі з фільтрами виймають з сушильної шафи та переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм CaCl_2 або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор встановлюють біля аналітичних вагів, на яких будуть проводити зважування. Через годину фільтри зважують із точністю до 0,0001 г. Етапи висушування та зважування повторюють із дотриманням зазначеної послідовності, доки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її значеннях не будуть перевищувати $\pm 0,0001$ г.

Наступним етапом є відокремлення мікроорганізмів від середовища, яке будемо здійснювати фільтруванням, адже обраний продуцент *Rhizopus oryzae* ЗАСЗ належить до міцеліальних грибів. Для цього паперовий фільтр розміщують у скляну лійку й фільтрують через нього точно виміряний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою.

Заключним етапом є визначення маси сухих клітин. З цією метою фільтр із осадом клітин мікроорганізму розміщують у сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування й зважування є тим самим, як і при визначенні маси фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = \frac{(A - B) \times 1000}{V},$$

де M – суха біомаса, г/л;

A – маса фільтра з осадом, г;

B – маса фільтра без осаду, г;

V – обсяг культуральної рідини, узятий для фільтрування, мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища й ретельністю зважування [50].

9.2.2. Визначення ліполітичної активності

Ферментативну активність ліпази визначаємо спектрофотометрично з використанням *p*-нітрофеніл лаурату (*p*-NPL) [16].

Принцип методу. Метод ґрунтується на гідролізі *p*-нітрофеніл лаурату

ліпазою з утворенням п-нітроферолу, який має характерне поглинання при 410 нм, що дозволяє визначити активність ферменту за зміною оптичної густини.

Хід роботи. Для підготовки субстрату 1 мл ізопропанолу, що містить 0,001 г п-нітрофеніл лаурату, змішують з 9 мл буферного розчину Трис-НСІ (0,05 М, рН=7,5), що містить 50 мкл Тритону Х-100 та 0,01 г акацієвої камеді (гуміарабіку).

В реакційну колбу додають 700 мкл свіжоприготованого субстрату та 300 мкл розведеного ферментного розчину, ретельно змішують. За допомогою спектрофотометра вимірюють поглинання при 410 нм вимірюють кожні 15 сек упродовж 3 хвилин.

Одна одиниця (U) ліпазної активності визначається як кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль п-нітрофенолу з п-нітрофеніл лаурату за 1 хвилину в умовах проведення аналізу [16].

9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Rhizopus oryzae* є ксилоза (деревний цукор – моносахарид-альдопентоза).

Обираємо такий метод кількісного визначення ксилози, як реакційна UV-Vis спектрофотометрія. Даний метод базується на утворенні кольорового комплексу, який поглинає світло при певній довжині хвилі, що дозволяє точно виміряти концентрацію ксилози в зразку культуральної рідини.

Принцип методу. Метод ґрунтується на утворенні кольорового комплексу між ксилозою та орцинолом, який в присутності концентрованої сірчаної кислоти дає забарвлення. Інтенсивність забарвлення є пропорційною концентрації ксилози в зразку культуральної рідини і вимірюється спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм.

Матеріали та реактиви: 1 мл супернатанту культуральної рідини, 2 М концентрованої сірчаної кислоти, 1 мл 0,2%-го розчину орцину, 0,5 мл 0,1%-го розчину хлориду заліза (III), дистильована вода.

Хід роботи. Готують супернатант – в центрифужні пробірки відбирають 150

мл культуральної рідини та центрифугують упродовж 15 хвилин при 5000 об/хв. До 1 мл супернатанту додають 1 мл 2 М H_2SO_4 , підігрівають у термоблоці при температурі 100°C упродовж 10 хв. Після охолодження додають 1 мл орцину, 0,5 мл FeCl_3 та доводять до об'єму 5 мл дистильованою водою. Далі струшують, інкубують протягом 15 хв. при кімнатній температурі та вимірюють поглинання при 671 нм. Для калібрування готують серію стандартів ксилози від 100 до 500 мг/л та будують калібрувальний графік. Концентрацію ксилози в зразку культуральної рідини визначають за калібрувальною кривою [51].

Визначення концентрації джерела азоту

Джерелом азоту в середовищі для культивування *Rhizopus oryzae* ZAC3 є дріжджовий екстракт, тому для визначення концентрації амінного азоту обираємо метод формольного титрування з супернатанту.

Принцип методу. Метод ґрунтується на реакції конденсації вільних аміногруп амінокислот з формальдегідом, що призводить до утворення похідних амінокислот. Таким чином, властивості аміногруп блокуються, а карбоксильні групи вивільнюються і можуть бути відтитровані розчином луґу.

Матеріали та реактиви: складчастий паперовий фільтр, сухий хлористий барій, супернатант культуральної рідини, 0,1%-й розчин фенолфталеїну, 0,01 моль/л розчину соляної кислоти, 0,05 моль/л розчину гідроксиду калію, формольна суміш (до 50 мл 40%-го розчину формальдегіду додають 10 крапель 0,1%-го розчину фенолфталеїну, потім по краплях додають 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію до утворення слабо-рожевого забарвлення).

Хід роботи. Готують супернатант – в центрифужні пробірки відбирають 150 мл культуральної рідини та центрифугують упродовж 15 хвилин при 5000 об/хв. До 25 мл супернатанту в колбу додають 1 г хлористого барію, 10 крапель розчину фенолфталеїну і перемішують. Баритну воду додають до суміші, поки не з'явиться ледь помітне рожеве забарвлення. Колбу закривають і залишають на 15 хв. Далі виконують розбавлення водою до обсягу 100 мл і проводять фільтрування через складчастий паперовий фільтр від фосфорнокислих та вуглекислих солей барію.

Потім готують дві колби об'ємом 100 мл, в одну з яких вносять 40 мл фільтрату, а в другу – 40 мл дистильованої води. Додають по 10 крапель фенолфталеїну і розчин соляної кислоти до фарбування розчинів в ледь помітний рожевий колір. Слід зазначити, що колір у двох пробірках має бути однаковим. Обчислюють кількість амінного азоту в мг/мл із врахуванням, що маса 1 мл 0,05 М розчину гідроксиду калію відповідає 0,7 мг амінного азоту [52].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chandra, P., Enespa, Singh, R. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact* **19**, 169 (2020). DOI:<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
2. Селекція продуцентів позаклітинної ліпази для використання в біотехнології / А.В. Борисенко, М.М. Антонюк, В.Л. Айзенбергтаін. // Наукові праці НУХТ. — 2010. — №33. — С. 35 — 37.
3. Kumar, A., Dhiman, S., Krishan, B. *et al.* Microbial enzymes and major applications in the food industry: a concise review. *Food Prod Process and Nutr* **6**, 85 (2024). DOI: <https://doi.org/10.1186/s43014-024-00261-5>
4. López-Fernández J, Benaiges MD, Valero F. Rhizopus oryzae Lipase, a Promising Industrial Enzyme: Biochemical Characteristics, Production and Biocatalytic Applications. *Catalysts*. 2020; 10(11):1277. DOI:<https://doi.org/10.3390/catal10111277>
5. Ali, Sajid & Afzal Khan, Sumera & Hamayun, Muhammad & Lee, In-Jung. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*. DOI:[10.3390/microorganisms11020510](https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510)
6. Ghosh P.K., Saxena R.K., Gupta R., Yadav R.P., Davidson S. Microbial lipases: production and application // *Sci. Progress*. – 1996. – Vol. 79. – P. 119-157.
7. McIlhargey, T. L., Yang, Y., Wong, H., & Hill, J. S. (2003). Identification of a lipoprotein lipase cofactor-binding site by chemical cross-linking and transfer of apolipoprotein C-II-responsive lipolysis from lipoprotein lipase to hepatic lipase. *The Journal of biological chemistry*, 278(25), 23027 –23035. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M300315200>

					НУХТ БТЕК 04.02.37 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ					
Розроб.		Бірюкова А. В.						Літ.	Арк..	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.							87	7
Реценз.		Пухляк А. Г.						Кафедра БТМ ⁸⁷		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В. П.								

8. Crystal structure of lipase from *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.rcsb.org/structure/6A0W>
9. Chandra, P., Enespa, Singh, R. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact* **19**, 169 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
10. Akram, F., Mir, A. S., Haq, I. U., & Roohi, A. (2023). An Appraisal on Prominent Industrial and Biotechnological Applications of Bacterial Lipases. *Molecular biotechnology*, *65*(4), 521–543. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00592-z>
11. Lotti, Marina & Alberghina, Lilia. (2007). Lipases: Molecular Structure and Function. 10.1007/1-4020-5377-0_16. DOI: [10.1007/1-4020-5377-0_16](https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_16)
12. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2019). *Biochemistry* (9th ed.). W. H. Freeman.
13. Lombardo, Dominique (2001). "Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **1533** (1): 1–28. doi:[10.1016/S1388-1981\(01\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00130-5). PMID [11514232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11514232/).
14. Пескова Л. О. Фермент ліпаза: аналіз галузей використання, продуцентів, способів одержання / Л. О. Пескова, Н. В. Дехтяренко // Наукові вісті Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут". - 2014. - № 3. - С. 63-72.
15. Kumar, A., Verma, V., Dubey, V. K., Srivastava, A., Garg, S. K., Singh, V. P., & Arora, P. K. (2023). Industrial applications of fungal lipases: a review. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1142536. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142536>
16. Ayinla ZA, Ademakinwa AN, Agboola FK. Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus* sp. ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil

- of a Palm Oil Processing Shed. J App Biol Biotech. 2017; 5 (02): 030-037.
DOI:[10.7324/JABB.2017.50205](https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50205)
17. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курсової роботи для здобувачів освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч. / уклад.: Т. П. Пирог, В. О. Красінько, С. О. Старовойтова. – К.: НУХТ, 2022. – 56 с.
18. Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1999). *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. Maryland: Aspen publication, 593 p. ISBN ISBN 0-8342-1306-0.
19. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*. 3rd Edition, Springer Dordrecht Heidelberg London New York Cambridge, 519 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
20. Taxonomic status *Rhizopus oryzae*. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу:
<https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/Rhizopus%20Oryzae>
21. Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя» № 13-14 (549-550), 2023 р. – [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2023/ZU_13_14_2023/ZU_13-14_2023_36-38.pdf
22. Faraz Ahmed, Yuan Bing Ma, Xuejie Niu, XiaoJun Bian, Yixuan Ding, Yong Zhao, Pradeep K. Malakar, Emerging technologies for lipase detection in dairy: A review, Journal of Food Composition and Analysis, Volume 136, 2024, 106802, ISSN 0889-1575, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106802>
23. І.Г. Власенко, Т.В. Семко, С.В. Гирич. Інновації у виробництві твердих сирів – Вінниця, РВВ ВТЕІ КНТЕУ, 2018. – 144 с.

24. Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
25. Abd Elmontaleb, Hani & Hamdy, Shaimaa & Abbas, Kh & Beyomi, Ratiba & Degheidi, M. (2016). Effect of Adding microbial Lipase on the Acceleration Ripening of UF-Ras Cheese. *Menoufia Journal of food and dairy science* 1(1):45-52. DOI: [10.21608/mjfds.2016.176652](https://doi.org/10.21608/mjfds.2016.176652)
26. Чмут А. В. Антош Н. В. (2018). Стан та тенденції розвитку ринку молока та молочної продукції в Україні. *Економіка і суспільство*, Вип. 17. С. 174–181. DOI: <https://doi.org/10.32782/2524-0072/2018-17-26>.
27. АНАЛІЗ РИНКУ СИРУ УКРАЇНИ. – [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.koloro.ua/ua/doslidzhennya/analiz-rynku-syru-ukrayiny-2/>
28. Україна займає останнє місце в Європі за споживанням сиру. – [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.seeds.org.ua/ukraina-zajmae-ostannye-misce-v-yevropi-za-spozhivannyam-siru/>
29. Компанія «ТЕРРА ФУД». – [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://mind.ua/companies/741-terrafood>
30. Рожищенський сирзавод. – [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://terrafood.ua/archives/factory/rozhishhenskij-sirzavod>
31. Farkye, Nana & Vedamuthu, Ebenezer. (2005). *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*, Third Edition (pp. 479 – 513). DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/0471723959.ch10>
32. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курсової роботи для здобувачів освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч. / уклад.: Т. П. Пирог, В. О. Красінько, С. О. Старовойтова. – К.: НУХТ, 2022. – 56 с.

33. Pentose and glucuronate interconversions - *Aspergillus oryzae*. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aor00040>
34. Пирог, Т. П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010 – 632 с.
35. Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів: постанова Кабінету Міністрів України від 20 серпня 2008р. №717. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-п#Text> (Дата звернення: 15.04.2025)
36. «Данаклін 3Д». – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p2512257990-danaklin-1000.html?srsId=AfmBOoqBja1Z6m43ZJnpD3hI_MSrKhOeOEiySRFVZT_VeEPomR4jsb3X
37. «Інструкція-НАТА», каністра 5 літрів. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://medshop.com.ua/ua/sterilizaciya-dezinfekciya/sredstva-dlya-dezinfeksii/instrutsid-nata-kanistra-5-litrov.html>
38. Засіб дезінфекційний з миючим ефектом «БАЛУ® ПРОФІ ДЕЗ». – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://gipermed-market.com.ua/uk/product/balu-profi-dez/>
39. Дезінфекційний засіб «Віндез НОК» – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://sans.com.ua/katalog/dezinfekcyniy-zasb-vndez-nok/#:~:text=Опис%3A,зі%20слабким%20запахом%20оцтової%20кислоти>
40. «Даноксин», 5 кг. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p1798536631-danoksin.html?srsId=AfmBOopAF5FQObv8ysKZmC26eyu8SSm4a9zrdNtJP_VgQgBTSuXqEHArx
41. Антисептичний засіб для рук і шкіри ВІОsept з Алое вера. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://medmarket.kh.ua/ua/p1462607458-antisepticheskoe-sredstvo-dlya.html>

42. Стеридол – спиртовий антисептик для гігієнічної та хірургічної обробки рук та шкірних покривів. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p2511820057-steridol.html?srsltid=AfmBOoqf2b52AU4dbEk7rye-di6S6CD4m-23VZJ-VvQXt9QrfRGwldOM>
43. Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 “Біотехнологія та біоінженерія” денної форми навчання / Ю. Ф. Дехтяр. – Миколаїв : МНАУ, 2017. – 99 с.
44. Jasińska K, Zieniuk B, Fabiszewska A, Wierzchowska K. Investigating Culture Media for Obtaining Lipolytic Biocatalysts Based on *Rhizopus oryzae* Fungi. *Biology and Life Sciences Forum*. 2022; 18(1):27. DOI: <https://doi.org/10.3390/Foods2022-12965>
45. Wang, J. R., Li, Y. Y., Xu, S. D., Li, P., Liu, J. S., & Liu, D. N. (2013). High-level expression of pro-form lipase from *Rhizopus oryzae* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *International journal of molecular sciences*, 15(1), 203–217. <https://doi.org/10.3390/ijms15010203>
46. Strinska, Hristina & Petrov, D & Panajotova, Hristina & Dobрева, Valentina & Zhekova, B & Dobrev, Georgi. (2017). Isolation and purification of lipase from *Rhizopus arrhizus* by ultrafiltration and fractional precipitation. *Bulgarian Chemical Communications*. 49. 137-143.
47. Selvaraj Raja , Vytla Ramachandra Murty , Varadavenkatesan Thivaharan, Vinayagam Rajasekar , Vinayagam Ramesh , "Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review", *Science and Technology*, Vol. 1 No. 1, 2011, pp. 7-16. DOI: [10.5923/j.scit.20110101.02](https://doi.org/10.5923/j.scit.20110101.02)
48. Costa-Silva, Tales & Souza, Cláudia & Oliveira, Wanderley & Said, Suraia. (2014). Characterization and spray drying of lipase produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(4), 849-858. DOI: [10.1590/0104-6632.20140314s00002880](https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140314s00002880)

- 49.Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни „Загальна мікробіологія та вірусологія” для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / Укл.: ст. викладач Філімоненко О.Ю.,– Кам'янське: ДДТУ, 2019– 56 с.
- 50.Мельничук М.Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
- 51.Pham PJ, Hernandez R, French WT, Estill B and Mondala AN. A Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of Xylose in Fermentation Medium. *Biomass and Bioenergy* 2011 July 35 (7), 2814-2821. DOI:[10.1016/j.biombioe.2011.03.006](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.006)
- 52.Практикум з біохімії для студентів технологічних спеціальностей денної форми навчання. Частина 1 / Укладачі: Г. О. Нікітін, А. І. Салюк, О. І. Семенова, Н. О. Бублієнко, А. В. Котинський, Н. В. Левітіна, В. В. Жовнірський, – К.: НУХТ, 2004. – 101 с.