

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра біотехнології**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ТЕХНІЧНЕ ПЕРЕОСНАЩЕННЯ ВИРОБНИЦТВА
ХАРЧОВОГО ФЕРМЕНТУ ГЛЮКООКСИДАЗИ»**

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи БТб18(4,4з)-01а
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія

Дар'я ЮЩЕНКО

Керівник: Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології,
д.фарм.н, доцент Микола РИБАЛКІН

Рецензент: Доцент закладу вищої освіти кафедри технологій
фармацевтичних препаратів, к.фарм.н, доцент Дмитро
СОЛДАТОВ

АНОТАЦІЯ

У кваліфікаційній роботі, присвяченій технічному переоснащенню виробництва харчового ферменту глюкооксидази, розглянуто отримання ферменту мікробіологічним синтезом на основі продуцента міцеліального гриба *Penicillium vitale* та запропоновано на стадії сушки ферменту встановити вакуумну сушарку, що дозволить отримувати кінцевий продукт високої якості, зменшити час проведення процесу та витрати сировини. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, десяти розділів, графічних матеріалів, висновку, списку використаної літератури із 23 найменувань та додатків. Загальний обсяг роботи - 95 сторінок, 20 рисунків, 15 таблиць, 3 креслень формату А1.

Ключові слова: біотехнологія, ферментні препарати, сушарка, продуцент, *Penicillium vitale*.

ANNOTATION

In the qualification paper, dedicated to the technical re-equipment of the production of the food enzyme glucooxidase, the production of the enzyme by microbiological synthesis based on the producer of the mycelial fungus *Penicillium vitale* was considered, and it was proposed to install a vacuum dryer at the enzyme drying stage, which would allow obtaining a high-quality final product, reducing the time of the process and the consumption of raw materials. The qualification work consists of an introduction, ten chapters, graphical materials, a conclusion, a list of used literature from 23 items and appendices. The total volume of work is 95 pages, 20 figures, 15 tables, 3 A1 format drawings.

Key words: biotechnology, enzyme preparations, dryer, producer, *Penicillium vitale*.

<i>Найменування виробу, об'єкту</i>	<i>Найменування документу</i>	<i>Ф о р м а т</i>	<i>Кі ль кі с т ь ли с т ів</i>	<i>П ри мі т ка</i>
	<u>Документація загальна</u>			
	Завдання	A4	1	
	Пояснювальна записка	A4	99	
	<u>Конструкторські документи</u>			
Виробництво	Технологічна схема	A1	1	
харчового ферменту				
Те ж	Апаратурна схема	A1	1	
Сушарка	Креслення загального вигляду	A1	1	
	апарату			
	<u>Проектна документація для</u>			
	<u>будівництва</u>			
Цех з виробництва	План цеху	A1	1	
ферментних препаратів				
	<u>Плакати</u>			
Економічна частина	Таблиця	A1	1	

ВСТУП

Актуальність. Сьогодні у харчовій промисловості широко використовуються ферментні препарати. Процеси, які відбуваються в сировині під дією власних ферментів, називаються дозріванням. Це ключовий етап харчової технології, який часто визначає інфраструктуру галузі в цілому. Механізм дії власних ферментних систем при переробці харчової сировини контролюється режимом та умовами, які забезпечують цілеспрямований розпад біополімерних систем з утворенням смакових та ароматичних речовин, формування необхідних реологічних та функціонально-технологічних властивостей харчових систем і, як наслідок, – досягнення бажаних органолептичних показників, високого рівня якості, харчової та біологічної цінності готових продуктів. Саме тому сьогодні широкого використання в харчовій промисловості знаходять ферментні препарати.

Під час переробки різних видів органічної сировини використовуються ферменти рослинного, мікробного і тваринного походження. Рослинні ферменти специфічні відносно своїх природних субстратів, що визначає високу ефективність їх дії на рослинну сировину. У мікробному світі можна знайти продуцента майже всіх ферментів, що приймають участь в кругообігу органічних речовин. Це пояснює широке застосування мікробних ферментів харчовій промисловості і кормовиробництві. З тваринної сировини отримують обмежений асортимент ферментних препаратів які, як дорожчі, застосовуються рідше за мікробних.

Харчові ферментні препарати на відміну від чистих препаратів ферментів містять окрім активного ферменту баластні речовини, у тому числі і інших білків. Крім того, більшість ферментних препаратів є комплексними, тобто окрім основного ферменту, що має найбільшу активність, до його складу входять інші супутні ферменти.

Застосування ферментних препаратів в галузях харчової промисловості

					162.01.15.00 000 ПЗ	А...
2...	А...	М...	Підпис	П...		3

дозволяє інтенсифікувати технологічні процеси, покращувати якість готової продукції, збільшувати її вихід, а також заощадити цінну харчову сировину.

Ферментні препарати повинні задовольняти вимогам, що пред'являються конкретними технологіями не лише за типом каталізованої реакції, але і відносно умов їх дії : рН, температури, стабільності, присутності активаторів і інгібіторів, тобто тих чинників, які зумовлюють ефективність дії препарату в цьому середовищі і дозволяють правильно визначити технологічні режими його застосування. В залежності від мети застосування до ферментних препаратів висуваються певні вимоги не лише відносно складу ферментів і оптимальних умов їх дії, але і відносно ступеня очищення, вживаних наповнювачів, вартості і ряду інших параметрів.

Зараз у світі виробляється велика кількість ферментних препаратів для різних галузей харчової промисловості, що використовуються на різних стадіях технологічного процесу. Різні фірми випускають ферментні препарати під різними комерційними (торговими) назвами. Проте робота з пошуку нових продуцентів, створенню нових препаратів пролонгованої дії, очищенню ферментних препаратів, підвищенню їх стабільності ведеться дуже інтенсивно. Таким чином, тема роботи, присвячена технічному переоснащенню виробництва ферментного препарату глюкооксидази вітчизняного виробництва, є актуальною.

Метою роботи є удосконалення виробництва ферментного препарату глюкооксидази за рахунок технічного переоснащення стадії сушки продукту.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні **завдання**:

- проаналізувати вітчизняний ринок виробництва ферментних препаратів для застосування у харчовій промисловості;
- провести аналіз літератури стосовно виробництва ферментних препаратів на основі мікробного синтезу, розглянути загальні етапи виробництва мікробних ферментів та потенційні продуценти серед мікроорганізмів;

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн	Ан	Мб доцент	Підпис	Пн		4

- охарактеризувати фермент глюкооксидазу, яка випускається компанією «ENZIM» біотехнологічним методом глибинного культивування продуцента *Penicillium vitale*;

- обрати та розрахувати устаткування виробництва та основного обладнання - сушарки, що використовується на стадії отримання порошку ферменту;

- скласти біологічну, технологічну та апаратурну схеми виробництва із вказанням засобів автоматизації, спроектувати план виробництва ферментних препаратів на підприємстві;

- виокреслити критичні параметри виробництва, навести вимоги нормативної документації до випуску ферментних препаратів та виконання цих вимог на підприємстві;

- здійснити техніко-економічне обґрунтування запропонованих рішень щодо удосконалення виробництва ферментного препарату глюкооксидази.

Об'єктом роботи є харчовий фермент глюкооксидаза, що випускається заводом препаратів мікробіологічного синтезу «Ензим».

Предметом роботи є вивчення технології виробництва глюкооксидази з повним біотехнологічним циклом на основі культивування *Penicillium vitale* та удосконалення виробництва за рахунок впровадження сучасної вакуумної сушарки.

У роботі використано наступні наукові **методи**: літературно-аналітичний, математичний, порівняльний, графічний.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновані у роботі заходи щодо технічного переоснащення етапу отримання товарної форми продукції - сушки ферментного препарату є актуальними для впровадження на підприємстві та дозволять автоматизувати процес, знизити витрати сировини та час виробництва.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зм	Ан	№ докум	Підпис	Пд		5

1 МАРКЕТИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1 Розвиток ринку ферментних препаратів в Україні

Сучасний розвиток багатьох галузей промисловості і сільського господарства не можливий без використання ферментних препаратів. Виробництво ферментних препаратів займає одне з провідних місць у сучасній біотехнології і належить до галузей, обсяг продукції яких постійно зростає, а сфера застосування розширюється.

Термін «ферментний препарат» на сьогодні використовують як для характеристики ферментів промислового призначення, так і для опису фармакологічних засобів. Він вказує на основний діючий фермент у складі препарату і засвідчує його комплексність, тобто наявність супутніх ферментів.

Згідно із сучасною класифікацією біотехнологічних виробництв, виробництво промислових ферментів належить до так званого білого сектору біоекономіки. Він також включає виробництво біопалива, біоремедіацію ґрунтів і води.

Біоекономіка також охоплює зелений сектор (лісова, целюлозно-паперова, харчова промисловість, сільське господарство і рибальство) та червоний сектор (біофармацевтика). До біофармацевтики можна віднести виробництво медичних ферментних препаратів

Сучасний стан розвитку ринку ферментних препаратів на сьогодні вичерпно окреслений в оглядах дослідницької компанії Abercade. Згідно з дослідженнями Abercade Consulting, глобальний ринок ферментних препаратів щорічно збільшується в середньому на 10 %, європейський ринок - приблизно на 3,5 %. Ринок ферментів для харчової індустрії в Європі щорічно зростає на 8 %.

Стан ринку ферментних препаратів можна охарактеризувати передусім їх застосуванням у таких галузях, як харчова промисловість та виробництво СМЗ,

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
						6
2..	Ан	№ докум.	Підпис	Підп.		

Загальною тенденцією для України є те, що сучасні потреби промисловості у ферментних препаратах більш ніж на 80 % задовольняються за рахунок імпорту. На частку українських виробників припадає близько 20 %. При цьому впродовж останніх кількох років внутрішнє виробництво демонструє тенденцію до росту, що зумовлено попитом споживачів ферментів на вітчизняну продукцію.

Але незважаючи на швидкий розвиток вітчизняних виробників, експрес-аналізі зовнішньоекономічної діяльності на ринку ферментних препаратів, представленому Агентством промислових новин, підтверджується, що цей сектор є імпортозалежним. Загалом в останні роки експорт ферментних препаратів з України становить суму в 50 рази нижчу за суму імпорту.

Коло провідних компаній - виробників ферментів, які імпортують продукцію до України, можна окреслити наступними: Novozymes A/S (Данія), Danisco A/S (Данія), Shandong Longda Bio-Products KCo (Китай), Framelco B.V. (Нідерланди).

1. Novozymes A/S (Данія) - компанія-лідер світового ринку ферментів. За оцінками самої компанії, її частка на світовому ринку становить 47 %. Основним дистриб'ютором в Україні є ТОВ «Бі-А-Хім» (м. Київ). У структурі пропозицій компанії на українському ринку домінують ферменти для виробництва синтетичних мийних засобів (СМЗ).

2. Danisco A/S (Данія) - компанія є другою за обсягами продажу ферментів на світовому ринку (21 %). Теж має своє представництво в Україні - це ТОВ «Біовак» Україна, яке є офіційним представником компанії Biochem, яка своєю чергою і є офіційним представником продукції компанії Danisco A/S та безпосередньо її підрозділу компанії Danisco Animal Nutrition - світового лідера з виробництва ферментів і бетаїну для комбікормової промисловості.

3. Shandong Longda Bio-Products KCo (Китай) - компанія спеціалізується на виробництві ферментів для промислового використання. На український ринок

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
						9
2..	Ан	№ документа	Підпис	П...		

постачає ензими для спиртової промисловості, власного представництва в Україні не має.

4. Framelco B.V. (Нідерланди) - компанія, що спеціалізується на виробництві різних кормових добавок. Офіційним імпортером Framelco B.V. в Україні є компанія Вудгофф.

Перспективи і сучасний стан галузі хімічного та нафтохімічного виробництва в Україні, і зокрема виробництва промислових ферментних препаратів, окреслені в аналітичній доповіді Національного інституту стратегічних досліджень «Пріоритети політики імпортозаміщення у стратегії модернізації промисловості України».

У доповіді наголошується, що пріоритетними напрямками імпортозаміщення у хімічному та нафтохімічному виробництві слід вважати підгалузі, що виробляють високотехнологічну наукоємну продукцію - фармацевтичне виробництво, мікробіологічну промисловість, виробництво пластмас, поверхнево активних речовин та мийних засобів. Перспективним для України напрямом розвитку внутрішнього ринку є мікробіологічне виробництво - виробництво амінокислот, вітамінів, ферментних препаратів, інсектицидів, біологічно активних речовин тощо.

Виробництва мікробіологічної промисловості належать переважно до шостого технологічного укладу, мають значний мультиплікативний ефект для інноваційного розвитку інших секторів - агропромислового комплексу, фармацевтики, харчової та легкої промисловості.

1.3 Характеристика українських виробників продукції мікробного синтезу

Випереджальний розвиток мікробіологічної промисловості здатний забезпечити підвищення врожайності сільськогосподарських культур, розвиток тваринництва, впровадження інноваційних продуктів у фармацевтичному виробництві, створення інноваційної продукції та продукції поліпшених смакових якостей у харчовій промисловості.

На сьогодні в Україні великим біотехнологічним підприємством залишається Ладижинський завод біо- та ферментних препаратів «Ензим», а також діють кілька дрібних виробників. Частка мікробіологічної промисловості у виробництві промислової продукції в Україні є меншою за 2 %.

Ладижинський завод біо- та ферментних препаратів «Ензим» (Вінницька обл., м. Ладижин). Ладижинський завод біо- та ферментних препаратів, який на сьогодні є найбільшим біотехнологічним промисловим майданчиком на території України, здатен випускати до 10000 товарних тонн продукції на рік, і спеціалізується на виробництві технічних ферментних препаратів. Після тимчасового занепаду в 90-х рр. підприємство відновило свою діяльність і навіть розширило асортимент продукції. Використовуючи 30-річний досвід роботи і сучасні технологічні рішення, воно виробляє продукцію високої якості, оперативно підбираючи оптимальні рішення для кожного конкретного споживача.

У таблиці 1.1 наведено характеристику продукції підприємства, систематизовану за такими трьома параметрами: продуцент ферментного препарату, склад препарату та сфери використання.

Таким чином, Ладижинський завод біо- та ферментних препаратів «Ензим» випускає широкий спектр ферментних препаратів з різним механізмом дії на основі бактерій та мікроскопічних грибів. Ферментні препарати цього

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ документа	Підпис	Пос		1

виробника використовуються в багатьох галузях народного господарства: в харчовій промисловості (виробництво борошняних кондитерських виробів, хлібопекарна, спиртова, виноробна, пивоварна, крохмале-патокова, плодоовочева, сироробна промисловість), у целюлозно-паперовій промисловості, в легкій промисловості (виробництво натуральних шкір), у хімічній промисловості (виробництво СМЗ), у сільському господарстві (птахівництво, тваринництво та рибицтво).

ТОВ «Дніпровська асоціація-К» (м. Київ). Підприємство створене в 2004 р. Напрями роботи підприємства - науково-виробнича діяльність, зокрема синтез і виробництво ферментних препаратів класу оксидаз і їх модифікацій, атестація препаратів для застосування в Україні та інших країнах, розроблення і впровадження проектів і технологій застосування ферментних препаратів.

Вказані напрями діяльності присвячені роботі з трьома препаратами: Агрозином, Оксізином і Дорзином. У характеристиках щодо складу препаратів, наведених на сайті виробника, зазначено, що Агрозин та Оксізин становлять комплексну органічну композицію, одержану ферментацією патоки цукрового буряку. Склад Дорзину виробники на сайті не подають.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	Мб доходу	Підм	Пн		1

Таблиця 1.1 - Характеристика продукції Заводу біо- та ферментних препаратів «Ензим» (Вінницька обл., м. Ладизин)

NVKPI_2013.pdf - Foxit Reader

Файл(F) Правка(E) Вид(V) Інструменти(T) Коментарі(C) Форми(m) SharePoint Поміть(H)

6 (6 / 11)

Страницы

5

6

7

8

Таблиця. Характеристика продукції Ладизинського заводу біо- та ферментних препаратів «Ензим» (Вінницька обл., м. Ладизин)

Назва препарату	Продукент ферментного препарату	Склад препарату	Сфери використання препарату
Ладозим "Респект"	Мікроскопічний гриб <i>Trichoderma reesei</i> , вирощений глибинним способом	Містить 28 ферментів, основними з яких є целюлаза, целобаза, бетаглюканаз, пектинліаза, полігалактуроназа і ксиланаза	Для раціонів бройлерів, курей-несучок і свиней, що містять підвищену кількість некрохмалистих полісахаридів: бетаглюканів, ксиланів і пектинів
Ладозим "Проксі"	Мікроскопічний гриб <i>Aspergillus ficum</i> , вирощений глибинним способом	Містить фітазу – специфічний фермент рослин і мікроорганізмів, здатний розщеплювати фітінні сполуки – фітати	Для раціонів бройлерів, курей-несучок, качок-несучок і свиней з метою переведення корму в доступну для засвоєння форму
Протосубтилін ГЗх	Штам <i>Bacillus subtilis</i> , вирощений глибинним способом	Містить комплекс нейтральних і лужних протеаз, α -амілазу, β -глюканазу, ксиланазу та целюлазу	У тваринництві і птахівництві, в спиртовій промисловості, в рибицтві і в шкіряній промисловості
Ксилалад	Селекційний штам <i>Penicillium canescens</i>	Містить енд-1,4-ксиланазу	Для раціонів тварин і птахів з метою гідролізу некрохмалистих полісахаридів корму – арабіноксиланів і пентозанів. Також у хлібопеченні для розщеплення некрохмалистих полісахаридів борошна
Альфалад	<i>Aspergillus oryzae</i> і <i>Penicillium canescens</i> , вирощені глибинним способом	Містить три ензими: ксиланазу, кислі амілазу і протеазу	Для раціонів тварин і птахів з переважанням вмісту сої, пшениці і кукурудзи
Альфалад БТ	<i>Aspergillus oryzae</i> і <i>Penicillium canescens</i> , вирощені глибинним способом	Містить α -амілазу	У харчовій промисловості для низькотемпературної схеми розварювання крохмалевмісної сировини
Альфалад БН	<i>Aspergillus oryzae</i> і <i>Penicillium canescens</i> , вирощені глибинним способом	Містить α -амілазу	У харчовій промисловості для високотемпературної схеми розрідження крохмалевмісної сировини
Проторизин	Продукент <i>Aspergillus oryzae</i>	Містить комплекс протеолітичних ферментів	У тваринництві, рибицтві і птахівництві як домішка до комбікормів і преміксів
Целюлад	Продукент <i>Trichoderma reesei</i>	Комплексний ферментний препарат, який містить целюлолітичні ферменти	Для біоутилізації целюлозовмісних матеріалів, силосування кормових трав із підвищенням вмісту целюлози, а також для прискорення трансформації соломи в біогумус. У харчовій промисловості, а саме в хлібопеченні, для розщеплення некрохмалистих полісахаридів борошна

6 / 11

94.30%

16:19 06.11.2022

Продовження таблиці 1.1

NVKPI_2013.pdf - Foxit Reader

Файл(F) Правка(E) Вид(V) Інструменти(T) Коментарі(C) Форми(m) SharePoint Поміть(H)

7 (7 / 11)

Страницы

5

6

7

8

Кінець табл.

Назва препарату	Продукт ферментного препарату	Склад препарату	Сфери використання препарату
Пектиназа	Продукт не вказаний	Містить комплекс пектолітичних ферментів, енто- і екзополігалактуроназу	У харчовій, соко-морсовій промисловості при виробництві і концентруванні соків, у виноробстві. Ефективний при обробці сировини з високим вмістом пектину (слив, агрусу, чорної смородини, айви тощо)
Протолад	Селекційний штаб <i>Bacillus subtilis</i>	Містить бактеріальну протеазу	У харчовій промисловості для переробки борошна з сильною клейковиною, для приготування борошняних кондитерських виробів (вафель, бісквіта, крекери, печива), при переробці м'яса і риби
Амліоризин	Продукт <i>Aspergillus oryzae</i>	Містить α -амілазу (тип ферменту – α -1,4-глюкан-4-глюканогідролаза)	У харчовій промисловості, а саме в хлібопеченні, для корекції вуглеводно-амілазного комплексу тіста
Беталад	Продукт <i>Penicillium canescens</i>	Містить комплекс ферментів для затирання, зокрема енто-1,4- β -глюканазу	На пивзаводах при затиранні, також може додаватися в пиво для гідролізу залишкових β -глюканів з метою усунення можливих проблем при фільтрації або під час зберігання пива
Глюкозооксидаза	Продукт не вказаний	Містить глюкозооксидазу	У харчовій промисловості для поліпшення окиснювальної дії, для виробництва сухої клейковини з фуражної пшениці зі слабкою клейковиною для її зміцнення. У виробництві сухих яєчних продуктів для знецукрення яєчного білка
Глюколад	Продукт не вказаний	Основний фермент – глюкоамілаза	У харчовій промисловості для оцукрення крохмалю при будь-яких схемах розварювання
Хімозан	Природний штаб <i>Penicillium canescens</i>	Ферментний препарат – 100 % хімозина	У виробництві сичужних сирів різних груп
Палпфор	Продукт не вказаний	Ферментний препарат целюлітичної дії	На целюлозно-паперових комбінатах на стадії розпуску целюлози (після рафінера)
Палпфор 2	Продукт не вказаний	Моноферментний препарат ксиланази (енто- β 1,4-D-ксиланаза, КФ 3.2.1.8)	На целюлозно-паперових комбінатах для вибілювання целюлози
Лужна протеаза	Продукт не вказаний	Ферментний препарат протеолітичної дії	У складі СМЗ для видалення з тканин білкових забруднень
Деструктор органічних відходів Комплексим	Продукт не вказаний	Спеціально підібрана композиція ефективних мікроорганізмів і ферментів для прискорення дозрівання компосту	Для компостування, для вигрібних ям і туалетів, для водойм

Пуск

7 / 11

94.30%

16:22
06.11.2022

Сфери використання ферментних препаратів є такими:

- Агрозин використовують для обробки сільгоспугідь із зерновими, овочевими, садовими культурами і виноградниками для поліпшення структури ґрунту та його водно-кисневого балансу, а також для активізації аеробних мікроорганізмів, що підвищує врожайність культур; для обробки ділянок, що не піддаються механічній обробці(сінокоси, пасовища, паркові лужки, футбольні поля); для обробки важких закислених ґрунтів з метою покращення їх структури і рівня рН.

- Оксізин використовують для очищення ємностей, технологічного устаткування переробної та харчової промисловості, водойм, стічних вод, ґрунту від органічних забруднювачів, нафти і нафтопродуктів; для дезактивації устаткування атомних електростанцій; для переробки медичних відходів; для миття місць громадського користування і залізничного транспорту; як засіб для ліквідації плям бензину, дизельного палива і олій на автозаправних станціях; для переробки органічних залишків, гною і посліду з метою швидкого отримання органічних добрив; для переробки відхожих місць з метою знищення запаху, прискореної переробки фекалій і збільшення глибини їх переробки; для обробки компостних ям з метою прискорення і глибини переробки компосту; для переробки нафтошламу в шламосховищах на нафтопереробних заводах і в місцях очищення залізничних цистерн; для очищення каналізаційних колекторів і відстійників; для очищення шкур тварин від жиру; для поліпшення санітарно-гігієнічного стану сховищ твердих побутових відходів (зникає запах, знищуються гельмінти, прискорюється процес переробки, збільшується глибина переробки); для поліпшення санітарно-гігієнічного стану (пропадає запах) у виробничих цехах м'ясокомбінатів, молокозаводів, харчосмакових фабрик; як аварійний запас у портах на випадок аварійної протоки паливно-мастильних матеріалів; як екологічно чистий розчинник органіки.

- Дорзин використовують при будівництві доріг, а саме для

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
2..	Ан	№ докум.	Підпис	Підп.		1

конструювання нових міцніших і менш проникних для вологи дорожніх основ і покриттів з використанням існуючих ґрунтових матеріалів. Перевагою ферментного препарату є те, що його потрібно всього 37 дм³ для обробки одного кілометра дорожнього покриття 8-метрової ширини завтовшки 15 см.

Для кожного препарату розробник наводить практичні рекомендації щодо застосування в різних сферах. Підсумовуючи, можна відзначити, що ферментні препарати ТОВ «Дніпровська асоціація-К» орієнтовані на потреби таких галузей: Агрозин використовується в сільському господарстві, Оксізин - для утилізації відходів у різноманітних галузях народного господарства, Дорзин - виключно в будівництві дорожньо-транспортного покриття.

Сучасне виробництво ферментів можна умовно розділити на компанії, що випускають товарні препаративні форми і ферментні субстанції для власного споживання. В останньому випадку одержаний продукт є культуральною рідиною, яка не доводиться до препаративної форми (концентрованої форми у вигляді гранул, порошку, пасти), а безпосередньо використовується у виробничому циклі. Подібний спосіб виробництва ферментів характерний для деяких спиртових підприємств.

Окремі спиртові заводи України для власних потреб і на продаж виробляють амілолітичні ферменти. Це, зокрема, ДП «Артемівський спиртзавод» (Харківська обл., м. Мерефа) - державне підприємство, що має унікальний цех для одержання ферментних препаратів і забезпечує власне виробництво, а також спиртові заводи України високоякісними ферментами для виготовлення спирту.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ар
						1
За	Ар	№ докум	Підпи	Па		

1.3 Характеристика харчових ферментів, що виробляються компанією «Ензим»

Об'єктом даної кваліфікаційної роботи є харчовий фермент глюкооксидаза.

Одним із найуспішніших виробником цього продукту в Україні є компанія Ензим, яка є лідером серед препаратів та продуктів, виробництво яких засновано на технологіях мікробного синтезу. Напрямами діяльності компанії є: рослинництво, тваринництво, фармацевтика, харчові ферменти, екологія, технічні ферменти.

Глюкозооксидаза ENZIM фермент, який каталізує окислення глюкози з утворенням перекису водню і глюконової кислоти. Фермент Глюкозооксидаза ефективно застосовується в борошномельної і хлібобулочної промисловості, для поліпшення якісних характеристик борошна і тіста.

Окрім глюкооксидази, компанія випускає і наступні харчові ферменти:

Інвертаза ENZIM - фермент для приготування інвертованого сиропу (інвертний сироп, глюкозо-фруктозний сироп), шляхом розщеплення сахарози на складові моносахара: глюкозу і фруктозу. Ферментний препарат отримують в результаті спрямованої глибинної ферментації штамма *Pen. Canescens*.

Альфа-амілаза ENZIM - фермент, що каталізує гідроліз альфа-1,4-глікозидних зв'язків крохмалю, що призводить до швидкого зниження в'язкості клейстеризованного розчинів крохмалю. Кінцевими продуктами дії альфа-амілази на крохмаль, є низькомолекулярні розчинні декстрини з невеликим вмістом моно- і дисахаридів (глюкози і мальтози).

Альфа-амілаза є ферментом широкого застосування і ефективно використовується в технологічних процеси різних галузей: виробництво спирту, синтетичних миючих засобів (СМС), хлібобулочних виробів, целюлозно-паперової та текстильної промисловості.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн.	Ан	Мб доцент	Підпис	Пп		1

Ферментний препарат отримують в результаті спрямованої глибинної ферментації штамма *Bacillus licheniformis*.

Бета-глюканаза ENZIM - фермент, що каталізує 1,3 і 1,4 глікозидні зв'язки з β -глюканів, розбиває макромолекули в'язкого полімеру до низьков'язких ізомальтози і мальтотріози. Фермент має значний рівень побічних активностей до розщеплення геміцелюлози, ксиланів та целюлози.

Бета-глюканаза є ферментом широкого застосування і ефективно використовується в технологічних процеси різних галузей: виробництво спирту і пива, целюлозно-паперової та текстильної промисловості.

Трансглютаміназа ENZIM фермент, органічний каталізатор хімічних реакцій, пов'язує білкові молекули, утворюючи нові зв'язки між амінокислотами, тим самим стабілізуючи структуру білка.

Трансглютаміназа підсилює важливі функціонально-технологічні характеристики протеїнів, завдяки своїй здатності каталізувати внутрішньо- і міжмолекулярної перехресне зшивання білкових молекул, що позитивно впливає на текстуру продукту.

Пектиназа ENZIM (полігалактуроноза, пектолаза) - пектолітичний фермент для гідролізу (розщеплення) рослинних полісахаридів (пектинових речовин). Ці речовини зазвичай містяться в рослинах не у вільному вигляді, а у вигляді складного комплексу, відомого під назвою протопектин.

Пектинові речовини утворюють гелеобразную масу і утримують сік, перешкоджаючи його відділенню. Особливо складно отримати соки без м'якоті із сировини з високим вмістом пектину (сливи, агрус, чорна смородина, айва тощо). Пектиназа ENZIM - ефективно застосовується для збільшення соковіддачі та поліпшення фільтрації при віджиму, а так само для освітлення соків та виноматеріалу.

Ліпаза ENZIM фермент, що каталізує гідроліз ефірних зв'язків тригліцеридів ліпідних субстратів, допомагаючи переварювати, розщеплювати і фракціонувати жири. Розщеплює важкорозчинні жири і масла.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн	Ан	Мб доцент	Підпис	Пн		1

Основні області застосування ферменту: виробництво сиру і переробка молока, виробництво синтетичних миючих засобів (СМС), виробництво косметологічних засобів, целюлозно-паперова промисловість, шкіряне виробництво і переробка шкур.

Глюкоамілаза ENZIM фермент, який розщеплює молекули декстринів і крохмалю з утворенням глюкози. Відмінною особливістю глюкоамілази є здатність в десятки разів швидше гідролізувати високомолекулярний субстрат, ніж оліго- та дисахариди. Ефективно застосовується для оцукрювання крохмалю та сировини, яка містить крохмаль.

Основні переваги препарату: прискорює оцукрювання крохмалевмісної сировини, покращує якісні характеристики готових виробів, збільшує вихід готового продукту.

Лактат кальцію ENZIM - (харчова добавка E327, кальцій молочнокислий, кальцієва сіль молочної кислоти, calcium dilactate, calcium lactate) - білий порошок, без запаху. Повільно розчинний у холодній воді, легко - в гарячій воді. Антиоксидант, регулятор кислотності, емульгатор. Донор кальцію в будь-які продукти харчування.

Застосовується: при виробництві хлібобулочної продукції для підгодівлі дріжджів; для закріплення структури ковбасних продуктів, подрібнених напівфабрикатів з м'яса, напівфабрикатів з птиці, морепродуктів, соусів, майонезів; у виготовленні хлібобулочних і желейних виробів використовується як затверджувач і емульгатор, стабілізує структуру продуктів; у напоях для оздоровлення, в спортивному харчуванні; харчуванні для дітей; в варення, в мармеладі, желе, маргарині; як регулятор рівня кислотності в сироварінні.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	Мб докум	Підпис	П		1

РОЗДІЛ 2. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

2.1 Загальна характеристика харчових ферментних препаратів

За хімічною будовою розрізняють *однокомпонентні ферменти* – прості білки, які при гідролізі утворюють лише амінокислоти, та *двокомпонентні* – складні білки, в яких як небілкові компоненти виступають нуклеотиди, вітаміни, метали тощо.

Сучасна міжнародна класифікація поділяє усі ферменти на 6 основних класів:

1. *Оксиредуктази* – ферменти, які каталізують окисно-відновні реакції (приєднання кисню, відщеплення та перенесення водню, перенос електронів). До них відносять дегідрогенази, оксигенази, електронази, цитохроми.

2. *Трансферази* – ферменти переносу. Вони каталізують перенесення цілих груп атомів від однієї сполуки на іншу, наприклад, залишків моносахаридів амінокислот, залишків фосфорної кислоти, металічних та аміногруп. До них відносяться фосфотрансферази, ацетилтрансферази та ін.

3. *Гідролази* – ферменти, які каталізують реакції розщеплення складних органічних сполук у присутності води. Ці реакції в загальному можуть бути зображені наступною схемою:



До цієї групи ферментів належать естерази, глікозидази, протеази.

4. *Ліази* – ферменти, які каталізують реакції відщеплення від субстратів певних груп з утворенням подвійних зв'язків або приєднанням окремих груп за подвійними зв'язками (наприклад, карбоксилаза).

5. *Ізомерази* – ферменти, які каталізують реакції ізомеризації, тобто внутрімолекулярного перенесення груп з утворенням ізомерних форм різних органічних сполук. Прикладом ізомерази є фосфогексаізомераза.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
						1
Зна	Ан	№ докум.	Підпис	Підп.		

6. *Лігази (синтетази)* – каталізують синтез складних органічних сполук з простих.

Найбільшу увагу технологів, які перероблюють біологічну сировину, привертають ферменти 1-го та 3-го класів, оскільки при переробці харчової сировини відбувається руйнування клітинної структури біологічного матеріалу, підвищується доступ кисню до подрібнених тканин та створюються сприятливі умови для дії ферментів типу оксигеназ, а також звільняються гідролітичні ферменти, які активно розщеплюють всі основні структурні компоненти клітини. В цьому розділі зупинимось на розгляді окремих представників цих двох найважливіших для харчової промисловості класів ферментів.

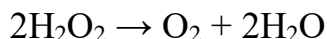
Клас 3. Оксиредуктази

Поліфенолоксидаза – фермент, який каталізує реакції, типовим прикладом яких є:



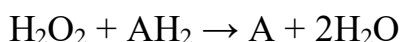
З дією цього ферменту пов'язане утворення темнозabarвлених сполук – меланінів при окисненні киснем повітря амінокислоти тирозину. Потемніння зрізаних картоплі, яблук, грибів та інших рослинних тканин залежить від дії поліфенолоксидази. Позитивна дія ферменту виявляється при деяких ферментативних процесах: наприклад, при ферментації чаю. Окиснення дубильних речовин чаю під дією поліфенолоксидази призводить до утворення темнозabarвлених та ароматичних сполук, які визначають колір та аромат чорного чаю.

Каталаза – фермент, який каталізує розклад гідроген пероксиду:



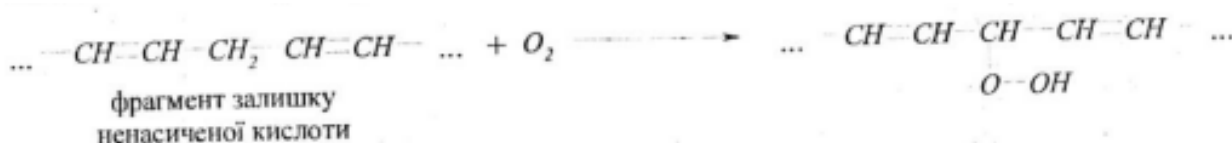
Джерелом для одержання промислових препаратів каталази є культури мікроорганізмів та печінка великої рогатої худоби. Каталаза знайшла застосування в харчовій промисловості для видалення надлишку H_2O_2 при обробці молока у виробництві сиру, де пероксид використовується як консервант; а також разом з глюкозооксидазою використовується для видалення кисню та слідів глюкози.

Пероксидаза – двокомпонентний фермент, який каталізує реакцію:



Найбільш активна пероксидаза виділена з коренів хрону.

Ліпоксигеназа каталізує окиснення поліненасичених високомолекулярних жирних кислот (лінолевої та ліноленової) киснем повітря з утворенням високотоксичних гідропероксидів за схемою:



жирна кислота + O_2 = гідропероксид жирної кислоти.

На цій дії засноване використання ліпоксигенази в харчовій промисловості.

Найбагатшим джерелом ліпоксигенази є соєве борошно. Цей фермент також широко розповсюджений в інших рослинах: пшениця, насіння маслинних та бобових культур, картопля, баклажани та ін.

Ліпоксигеназі належить важлива роль в процесах дозрівання пшеничного борошна, пов'язаних з покращенням його хлібопекарських властивостей. Під дією ферменту відбувається освітлення борошна, зміцнення клейковини, зниження активності протеолітичних ферментів та інші корисні зміни. Використання ліпоксигенази як підсилювача окисної дії вимагає певної обережності, так як добре відома токсичність переоокиснених жирів.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зна	Ан	№ докум.	Підпис	Підп.		2

Глюкозооксидаза – фермент, який окиснює глюкозу з утворенням глюконової кислоти. Він володіє практично абсолютною специфічністю по відношенню до глюкози. Сумарна схема дії цього ферменту має вигляд:



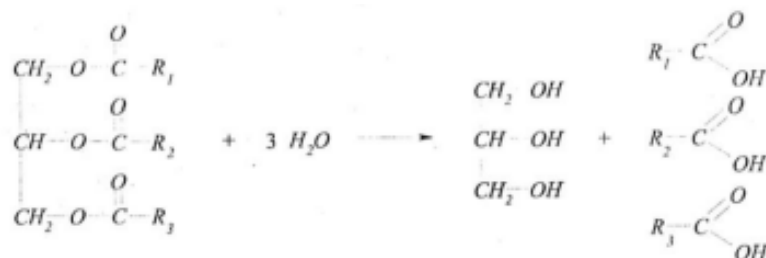
Високо очищені препарати глюкозооксидази одержують з пліснявих грибів роду *Penicillium vitale* та *Aspergillus niger*.

Останнім часом цей фермент знайшов широке використання як аналітичний засіб для кількісного визначення глюкози. Крім цього, препарати глюкозооксидази використовуються в харчовій промисловості як для видалення слідів глюкози, так і для видалення слідів кисню. Перше необхідне при обробці харчових продуктів, якість і аромат яких погіршується через наявність в них відновлюючих цукрів, друге – необхідне при обробці продуктів, в яких тривала присутність навіть невеликих кількостей кисню призводить до зміни аромату та кольору (пиво, вино, фруктові соки, майонез).

Клас 4. Гідролази

Роль ферментів цього класу в харчових технологіях надзвичайно велика. Для технологів найбільший інтерес представляють три підкласи ферментів класу гідролаз. Це ферменти, які діють на естерні зв'язки - *естерази*, на глікозидні сполуки – *глікозидази* та на пептидні зв'язки - *протеази*.

Ліпаза – це представник естераз, який каталізує реакцію розщеплення тригліцеридів за реакцією:

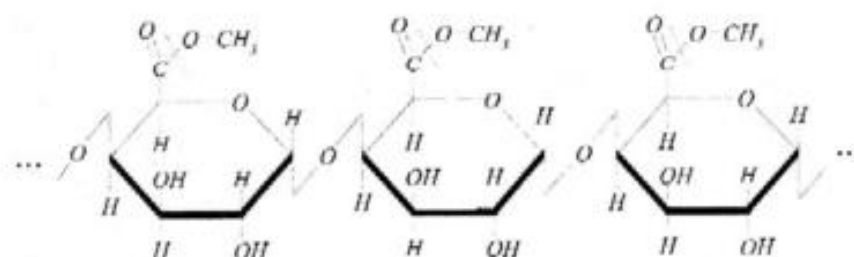


Ліпаза бере участь в процесах псування зернових продуктів при їх зберіганні. Накопичення вільних жирних кислот під дією ліпази (збільшення кислотного числа жиру) – ознака погіршення якості продукту. При цьому

ліпази ініціюють процеси прогіркання та обмежують термін зберігання харчових продуктів.

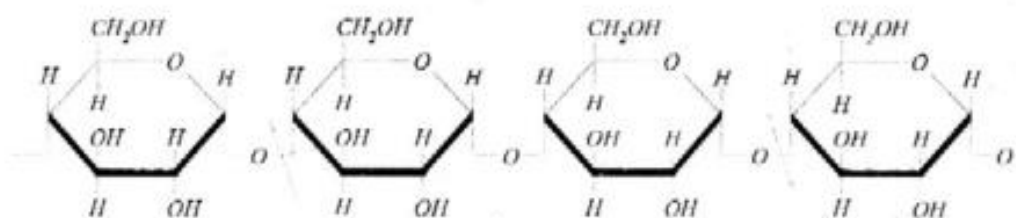
Одна з особливостей ліпази – здатність каталізувати зворотну реакцію, здійснювати синтез складних ефірів, а також спричиняти переестерифікацію тригліцеридів, тобто змінювати їх жирнокислотний склад. Завдяки цій властивості одержують аналоги масла какао з дешевої вихідної сировини.

Пектинестерази – ферменти класу естераз, які каталізують гідроліз естерних зв'язків в молекулах розчинного пектину з утворенням метанолу та полігалактуранової кислоти:



Під дією пектинестерази відбувається пониження желеутворюючих властивостей пектинових речовин. На цьому основане застосування цього ферменту для освітлення плодових соків та вина.

α-Амілази ферменти класу глікозидаз, які містяться в тваринах (слина та підшлункова залоза), рослинах (паростки пшениці, жита, ячменю), пліснявих грибах та бактеріях. Ці ферменти гідролізують крохмаль та глікоген з утворенням, головним чином, декстринів та мальтози:



Велике практичне значення на стабільність α-амілази має вплив температури та рН. Швидке руйнування її при рН 3,3-4,0 наприклад, дає можливість випікати житній хліб з борошна, яке містить надлишок α-амілази,

при низьких значеннях рН, щоб запобігти надлишковому декструванню крохмалю та утворенню клейких речовин у хлібі.

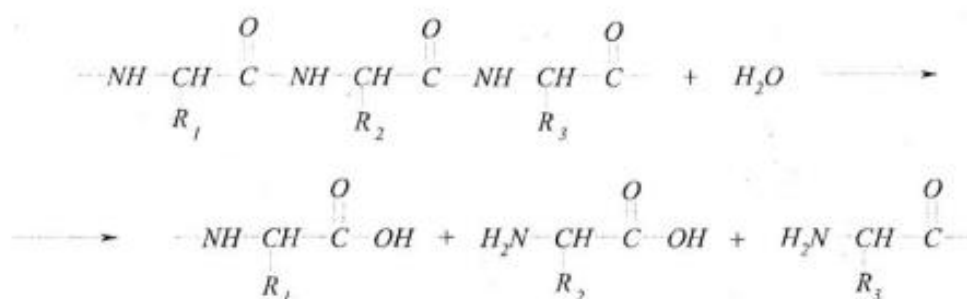
β-Амілаза ферменти класу глікозидаз, які містяться в основному у рослинах. Її джерелами є зерно пшениці, пшеничний та ячмінний солод, соєві боби, картопля.

Дія *β-амілази* полягає у відщепленні мальтози від нередукуючого кінця молекули полісахариду. На відміну від *α-амілази*, *β-амілаза* менш термостабільна, але виявляє більшу стійкість до кислих значень рН, зберігаючи свою дію при рН 3,3.

Інулаза – фермент (належить до класу глікозидаз), який здійснює гідроліз інуліну та інших поліфруктозанів з утворенням фруктози та незначної кількості глюкози (95% фруктози та 5% глюкози). Частково під її дією гідролізують сахароза та рафіноза. Одержані з інуліну таким чином фруктозні сиропи можуть бути широко використані в кондитерській промисловості та дієтичному харчуванні.

До глікозидаз також відносяться такі ферменти, як *глюкоамілаза*, *целюлаза*, *β-фруктофуранозидаза*, *β-галактозидаза*, та інші, які широко використовуються при виготовленні різних видів харчових продуктів.

Основною реакцією, яку каталізують *протеази*, є гідроліз молекул білків та пептидів за пептидними зв'язками:



В залежності від місця положення пептидних зв'язків, на які діють протеази, ці ферменти поділяються на ендопептидази (гідролізують пептидні зв'язки, які містяться в середині молекули білка) та екзопептидази

(гідролізують зв'язки на краях макромолекули білка).

Специфікою дії багатьох ферментів-протеаз є їх здатність розщеплювати пептидні зв'язки між залишками конкретних амінокислот. Протеази містяться в рослинних; тваринних та мікробних об'єктах навколишнього середовища.

Серед найбільш важливих з практичної точки зору ферментів цього класу виділяють:

- *папаїн та хімопапаїн* – використовуються в кіновиробництві, парфумерії, виробництві синтетичних миючих засобів, медицині та в харчовій промисловості (виноробство, пивоваріння, виробництво спирту, хлібопекарство тощо);

- *фіцін та бромелаїн* – використовуються аналогічно до папаїну, а також для видалення каламутності у пиві та для розм'якшення м'яса;

- *трипсин* – фермент тваринного походження, який використовується в медицині та в харчовій промисловості для виробництва гідролізатів;

- *пепсин* – фермент, дія якого виражається в гідролізі пептидних зв'язків, утворених аміногрупами фенілаланіну та тирозину. Він має надзвичайно важливе значення як травний фермент, він входить до складу лікарських ферментативних препаратів, тонізуючих засобів, жувальної гумки. В харчовій промисловості пепсин використовують для згортання казеїну молока та для розчинення білкової каламуті у пиві;

- *ренін* – фермент, подібний за дією до пепсину. Використовується як коагулянт казеїну молока.

Протеази – найбільш важливі промислові ферменти. Рівень споживання препаратів протеаз становить приблизно 40% від усіх використовуваних ферментів.

Ферментна промисловість випускає препарати різного ступеня очищення. Багато видів вітчизняних ферментних препаратів мають назви і індекси. Назва ферментного препарату включає назву основного ферменту і назву мікроорганізму-продуцента, із закінченням "-ин".

					162.01.15.00 000 ПЗ	4...
За...	А...	№ докум...	Підпис...	П...		2

Наприклад: амілоризин –основний фермент – амілаза, продуцент *Aspergillus oryzae*; протосубтилін – основний фермент – протеаза, продуцент *Bacillus subtilis*. Окрім цього, в назві обов'язково відбивається спосіб культивування мікроорганізму : Г – глибинне; П – поверхнєве, а також ступінь очищення – Х(2Х; 3Х; 10Х; 15Х; 20Х).

Індексом ГХ позначається неочищена культуральна рідина продуцента ферменту. Препарати ГХ використовуються переважно на місці вироблення. Так, в спиртовому виробництві застосовують культуральну рідину продуцентів амілолітичних і целюлітичних ферментів, що отримуються у ферментних цехах спиртзаводів.

У харчових виробництвах препарати ГХ придатні лише в технологічних процесах, де виключено попадання препарату в готовий продукт, наприклад, у виробництві спирту, де ферментні препарати видаляються з продукту в процесах відгону і ректифікації.

Препарати з індексом ГЗХ отримують шляхом розпилювального висушування концентрованої культуральної рідини. Концентрація проводиться методом вакуум-випарювання за температури, що не викликає інактивації ферментів (зазвичай не вище 30°C).

Препарати з індексом ГЗХ є неочищеними. Вони мають високий ступінь мікробного обсіменіння. Це обмежує сферу їх застосування. У харчовій промисловості препарати ГЗХ використовуються в тих же технологіях, що і ГХ. У сільському господарстві препарати ГЗХ широко застосовуються для обробки кормів з метою підвищення їх засвоюваності.

Індекс Г10Х мають препарати, отримані шляхом осадження органічними розчинниками з концентрованих фільтратів культуральної рідини. Перед фільтрацією культуральну рідину обробляють мінеральними або органічними коагулянтами, що дозволяє в процесі розділення фаз звільнити фільтрат від біомаси мікроорганізмів, баластних білків, полісахаридів, нуклеїнових кислот. Фільтрат концентрують вакуум-

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ докум.	Підпис	Пол		2

випаровуванням, додаючи за необхідності стабілізуючі агенти.

Препарати Г10Х мають значно більш високу чистоту, ніж ГХ, ГЗХ. Сфера застосування препаратів Г10Х охоплює різні харчові виробництва, галузі легкої і хімічної промисловості.

Препарати з індексом Г20Х отримують із застосуванням ультрафільтрації – способу концентрації, заснованої на розділенні речовин з різною молекулярною масою за допомогою напівпроникних мембран з певним розміром пор. Ультрафільтрації піддають заздалегідь очищені ферментні розчини, вільні від клітин мікроорганізмів і зависі.

З ультраконцентратів отримують рідкі і сухі форми ферментних препаратів. Рідкі форми стабілізують консервантами, наприклад, бензойною кислотою. Сухі форми отримують шляхом розпилювального висушування. Перед висушуванням в концентрат вносять стабілізатори і наповнювачі.

Препарати Г20Х застосовують у виробництві харчових продуктів і напоїв, в кормовиробництві, у складі лікарських засобів для лікування захворювань, пов'язаних з ферментною недостатністю.

Препарати з індексом Пх є висушеними культурами грибів – продуцентів ферментів, отриманими під час твердофазного культивування. Препарати Пх зберігають повний ферментативний комплекс продуцентів. Вони є неочищеними і мають високе мікробне обсіменіння. Застосовуються аналогічно препаратами ГЗх.

Препарати з індексами П10Х і П25Х отримують зі свіжих або висушених твердофазних культур грибів за наступною схемою: водна екстракція ферментів з культури гриба, відділення екстракту, осадження ферментів з екстракту етиловим або ізопропіловим спиртом, відділення ферментного осаду, суспендування осаду у воді, добавляння до суспензії стабілізаторів і наповнювачів, розпорошувальне висушування. Препарати П10х застосовуються аналогічно Г10Х, П25Х – аналогічно Г20Х.

Препарати з індексом П20Х отримують за схемою: екстракція ферментів

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ докум.	Підпис	Пол		2

з твердофазної культури, стерилізуюча фільтрація екстракту, ультрафільтрація, стандартизація і стабілізація ультраконцентрату розпилювальне висушування. Препарати застосовують аналогічно Г20Х.

Перераховані види ферментних препаратів відносяться до так званих розчинних, тобто до препаратів, активна частина яких розчиняється у водному середовищі. Після закінчення ферментативної обробки субстрату розчинний препарат залишається в реакційному середовищі і повторно не використовується.

Разом з розчинними випускають також іммобілізовані ферменти. Іммобілізація – це включення об'єкту в ізольовану фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але здатна з нею обмінюватися молекулами (субстратів, ефекторів).

Іммобілізовані ферменти отримують шляхом з'єднання з носіями розчинних ферментів або клітин мікроорганізмів, що мають ферментативну активність. Найбільш поширені способи з'єднання – це сорбція на носії (наприклад, у ферментному препараті іммобілізованого папаїну носієм є нейлонове полотно), ковалентне з'єднання і включення в структуру гелів-носіїв.

Іммобілізація наближає умови функціонування ферментів до природних. У природі велика частина ферментів асоційована із структурами живих організмів або елементами довкілля, що важливо для прояву активності ферментів і їх стабільності.

Іммобілізовані ферменти мають ряд переваг перед розчинними під час проведення процесів промислового біокаталізу. Іммобілізовані ферменти можна вилучити з реакційного середовища, що дозволяє контролювати хід ферментативної реакції і багаторазово використовувати ферментні препарати. Каталітичний процес можна проводити безперервно, пропускаючи розчини субстратів через реактори з іммобілізованими ферментами. Продукти реакції не забруднюються домішками ферментних препаратів. Іммобілізовані

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ докум	Підпис	Пол		2

ферменти мають високу операційну стабільність, а їх каталітичні властивості можна модифікувати, змінюючи спосіб з'єднання і вид носія.

Застосування іммобілізованих ферментів дозволило вирішити задачу створення великих промислових біокаталітичних процесів, за допомогою яких роблять амінокислоти, органічні кислоти, органічні розчинники, метан, антибіотики, гормональні препарати, роблять очищення стічних вод і водойм, біоконверсію органічних відходів.

2.2 Загальна схема виробництва мікробних ферментних препаратів

Основними стадіями загальної схеми виробництва ферментних препаратів за допомогою мікробіологічного синтезу є:

- Підбір та приготування живильних середовищ, що будуть мати оптимальний склад харчових компонентів для конкретного продуцента, для активації виробничих штамів, масштабування посівного матеріалу, культивування
- Робота з культурами - продуцентами - масштабування, культивування (глибинним, поверхневим або гетеро фазним методом)
- Виділення ферменту з культуральної рідини - фільтрацією, центрифугуванням, осадженням тощо або екстрагування з поверхневих культур
- Очищення ферментів - частіше за все осадженням у випадку водорозчинних ферментів, очистка методом абсорбції, мембранними методами
- Стабілізація та стандартизація ферментних препаратів.

Отримання ферментних препаратів за допомогою технологій мікробного синтезу на сьогоднішній день є найперспективніших і вигіднішим методом.

Культивування продуцента До мікроорганізмів – продуцентів ферментів – пред’являються наступні вимоги:

- наявність високої ферментативної активності;
- переважний синтез ферменту або групи ферментів, що діють на певний субстрат;
- генетична стабільність за ознакою синтезу ферменту або ферментів;
- досить висока швидкість росту;
- здатність рости на середовищах з доступними і недорогими джерелами живлення.

Культивування продуцентів ферментів проводяться в умовах стерильності - глибинний процес (*глибинне культивування*) або максимально можливого наближення до них - твердофазний процес (*поверхнєве культивування*).

Ферментна промисловість випускає великий асортимент препаратів мікробного походження, продуцентами яких є представники різних таксономічних груп. Велика частина валової кількості ферментів, особливо гідролітичних, виробляється на основі культивування бацил (передусім *B. subtilis*), мікроскопічних грибів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, а також актиноміцетів родів *Acyinomices*, *Streptomices*. Найчастіше використовують мезофільні штами аеробних мікроорганізмів.

Переважаючим способом культивування є глибинний, заснований на вирощуванні продуцентів в стерильних рідких середовищах з примусовою аерацією(для аеробних форм) і перемішуванням середовища, за автоматичного регулювання параметрів процесу, таких як температура, рН середовища, її редокс-потенціал, концентрація розчиненого кисню і ін.

Разом з глибинним застосовується твердофазний спосіб культивування, коли культури продуцентів вирощують на зволжених і простерилізованих твердих середовищах, таких як висівки, буряковий жом, подрібнена

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн	Ан	Мб доцент	Підпис	Пн		3

целюлозовмісна сировина, солодові паростки та ін. Твердофазне культивування складніше регулювати, ніж глибинний процес. Перевагою твердофазного процесу є те, що умови культивування максимально наближені до природних, в яких повністю реалізується біопотенціал мікроорганізмів.

Твердофазна культура добре аерується. У кінці ферментації отримують культуру у формі, зручній для виділення ферментних препаратів.

Глибинне культивування використовується як для аеробних, так і для анаеробних продуцентів, твердофазное - тільки для аеробних, саме для мікроскопічних і вищих базидальних грибів.

Екстрагування ферментів з поверхневих культур. Всі ферменти є водорозчинними білками, тому найкращим екстрагентом для них є вода. Для видалення ферментів з дріжджових та бактеріальних клітин їх необхідно зруйнувати використовуючи механічні, хімічні або біологічні методи, оскільки їхні клітинні стінки мають високий дифузійний опір. Оболонки міцеліальних клітин мають низький дифузійний опір, тому дезінтеграція клітин грибів не потрібна.

На повноту екстрагування ферментів впливають багато факторів: температура, рН, тривалість процесу, конструктивні особливості екстракційних апаратів.

Серед небажаних процесів, що можуть відбуватися після дезінтеграції клітин, – протеоліз власними клітинними протеазами цільового ферменту. Цей процес може відбуватися навіть при підтриманні низької температури, особливо при очищенні ферменту, оскільки після видалення супутніх білків фермент стає єдиним субстратом протеази. Інактивацію протеаз здійснюють обробкою клітинного екстракту специфічними інгібіторами-комплексонами (ЕДТА, о-фенантролін, оксихінолін), солями ртуті або срібла. Протеази можуть бути видалені також сорбцією на афінних сорбентах. Якщо протеази термолабільні, а цільовий фермент термостабільний, їх можна денатурувати нагріванням клітинних екстрактів.

					162.01.15.00 000 ПЗ	4
2.	4	№ докум.	Підпис	Підп.		3

Денатурацію нуклеїнових кислот в процесі очищення ферментів обумовлює низька іонна сила чи основність середовища. Можна використати спеціальні осадники, що утворюють з нуклеїновими кислотами нерозчинні комплекси. З цією метою використовують бромістий цетилтриметиламмоній, стрептоміцин сульфат, протаміносульфат, поліетиленімін. Інший метод видалення нуклеїнових кислот використання нуклеаз – панкреатичних ДНК-аз та РНК-аз.

Осадження ферментів. Переважна більшість промислово важливих ферментів є водорозчинними білками. Розчини ферментів можуть бути різного походження: екстракти з поверхневих культур мікроорганізмів, фільтрати з гомогенатів рослинних і тваринних тканин, лізати мікроорганізмів, фільтрат культуральної рідини, яку отримують при глибинному вирощуванні мікроорганізмів. Ці розчини ферментів неоднорідні і є складними системами, що містять крім ферментів велику кількість розчинних у воді сполук. Виділення ферментів з цієї складної суміші є непростим завданням, оскільки система дуже чутлива до зовнішніх впливів і тому забезпечення високого виходу ферменту в осад вимагає чіткого дотримання умов, при яких починається агрегування білкових молекул і випадіння їх в осад.

Розчинність білка визначається розподілом гідрофобних і гідрофільних залишків на поверхні молекули. Змінюючи деякі властивості білкових розчинів (температуру, іонну силу, рН, додавання нейтральних солей, водорозчинних органічних сполук або інших інертних речовин), можна вплинути на гідратний або сольватний шар і викликати агрегацію білкових молекул і випадання їх в осад.

Осадження ферментів органічними розчинниками. Ефект осадження білків пов'язаний з тим, що в присутності органічного розчинника знижується активність води. Зі збільшенням концентрації розчинника знижується здатність води до сольватації заряджених гідрофільних молекул ферменту. Діелектрична постійна розчинника знижується, відбувається витіснення

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ докум.	Підпис	Пол		3

молекул води з поверхні білкової молекули та їх часткова імобілізація молекулою органічного розчинника внаслідок гідратації білка. Тому молекули води, розміщені на гідрофобних ділянках поверхні білка, можуть бути заміщені на молекули органічного розчинника. При цьому розчинність білків знижується, відбувається агрегування і осадження білкових молекул.

Агрегування білків відбувається під дією електростатичних і Ван-дер-Ваальсових сил, що виникають між окремими білковими молекулами. Гідрофобна взаємодія, ймовірно, має менше значення в результаті впливу органічних розчинників на неполярні ділянки білкової глобули.

Органічний розчинник, який використовують для осадження, повинен повністю змішуватися з водою і не зв'язуватися з ферментом. Найбільш широко для осадження ферментів використовуються етиловий спирт, ацетон і ізопропіловий спирт. Рідше застосовуються метанол, н-пропанол, діоксан, 2-метоксиетанол і інші спирти, кетон, ефіри та їхні суміші. При виборі розчинника необхідно пам'ятати про його можливу токсичність, вибухонебезпечність і можливість регенерації. З урахуванням цього найбільш придатними для виробництва є етанол і ізопропанол, менше – ацетон. Найбільш перспективним вважається осадження ферментів ізопропанолом. Осадження білків здійснюється при порівняно низькій його концентрації (52 – 53%), і препарати містять на 40 – 45% менше баластних речовин, ніж за осадження ацетоном і особливо етанолом.

Наявність в розчині деяких іонів може мати стабілізуючу дію на фермент. Так, іони Ca^{+2} здатні до зберігання активності α -амілази, протеїназ, глюкоамілаз; захисною дією характеризуються іони магнію, марганцю, кобальту. Наявність електролітів часто дозволяє знизити витрату осадника і покращити структуру осаду.

Фракційне розділення ферментів органічними розчинниками. Різна розчинність ферментів в органічних розчинниках дозволила розробити способи їхнього розділення.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн	Ан	Мб доцент	Підпис	Пн		3

Так, розроблено метод фракційного осадження амілолітичних і протеолітичних ферментів з екстрактів культури *A. oryzae* за допомогою етилового спирту. За концентрації спирту в розчині 50% осаджується 70 – 80% протеаз, а амілази осаджуються лише на 5%. Підвищення концентрацій спирту в розчині не приводить до збільшення кількості осаджених протеаз, а амілази майже на 100% осаджуються за концентрації спирту 70%. Використовуючи ці властивості ферментів розроблено технологію отримання амілаз і протеаз з фільтратів глибинних культур. Для цього в розчин, що містить ферменти, додають етиловий спирт до концентрації 52-54%. З отриманої водно-спиртової суміші за допомогою сепаратора відділяють осад протеолітичних ферментів. Потім до водно-спиртової суміші повторно додають етиловий спирт до кінцевої концентрації 72%. З отриманою суміші за допомогою сепаратора виділяють осад амілолітичних ферментів.

Додавання одного об'єму ацетону до фільтрату культуральної рідини *B. subtilis* дозволяє майже повністю осадити амілази, за таких умов протеази осаджуються лише на 4-8%.

За допомогою фракціонування етиловим спиртом може бути розділено комплекс ферментів, що міститься в екстракті поверхневої культури *A. awamori*. Повне осадження декстриназ відбувається за концентрації етанолу 79%, амілази і протеази осаджуються за концентрації 73%, мальтаза повністю осаджується за концентрації спирту 66%.

Осадження ферментів висококонцентрованими розчинами солей (висолювання). Процес висолювання ферментів в основному залежить від ступеня гідрофобності білкової молекули. Типова білкова молекула має гідрофобні ділянки на поверхні у вигляді бічних ланцюгів низки амінокислот (тирозин, триптофан, лейцин, ізолейцин, метіонін, валін і фенілаланін). На гідрофобних ділянках молекули білка при контакті з водою відбувається утворення шару, що складається з орієнтованих молекул води.

Але таке впорядкування структур є термодинамічно нестійким, оскільки

					162.01.15.00 000 ПЗ	Am
2..	Am	№ документа	Підпис	Пол		3

в такій системі відбувається значне зниження ентропії в порівнянні з системою негідратований білок - вільні молекули води. Якщо молекули води іммобілізувати молекулами небілкової природи, то білкові молекули починають взаємодіяти і відбувається їхня агрегація. Відомо, що іони солей гідратуються, і при додаванні значної кількості солі відбувається зв'язування води, білок частково звільняється від води і створюються умови для агрегації білкових молекул.

Різні білки по-різному реагують на процес висолювання. Це залежить в першу чергу від кількості і розмірів гідрофобних ділянок на поверхні білкової молекули. Чим більше таких ділянок, тим легше відбувається висолювання білків. Існують білки, які навіть при дуже високій концентрації солі в розчині майже не агрегують і не випадають в осад. При осадженні ферментів зі складної суміші різноманітних білків має місце явище соосадження. Після дегідратації білкових молекул в розчині солей молекули білка агрегують не з ідентичним, а з будь-якими іншими клейкими молекулами, що знаходяться поблизу. Це приводить до отримання препаратів, збагачених різними супутніми речовинами. Проте при висолюванні можна досягти не лише осадження всього комплексу ферментів, але і його фракціонування.

Хоча висолювання білків в основному визначається гідрофобними взаємодіями, на цей процес істотно впливають і інші чинники: рН середовища, близькість його до ізоелектричної точки білка, температура, ступінь чистоти ферментного розчину, тривалість процесу і т.д.

Для висолювання в основному використовуються нейтральні солі лужних металів. Висолюючий ефект різних іонів залежить від їх іонної сили. Для висолювання можуть бути використані сульфат амонію, сульфат натрію, сульфат цинку і хлористий натрій. Найчастіше використовують сульфат амонію, рідше - хлористий натрій. Найбільше осадження білків відбувається при концентрації солі в розчині, близької до концентрації насичення. Але це не завжди зручно, так як в осад разом з білком захоплюється велика кількість

солі, що вимагає додаткового очищення препаратів і ускладнює їх застосування. Звичайно осадження ведуть розчином з концентрацією солі 0,5 – 0,9 від повного насичення, але і в цьому випадку в препарати переходить від 20 до 80% солі від маси осаду.

Найскладніша стадія процесу висолювання – це внесення солі і спосіб її розчинення. Сіль подрібнюють і поволі додають невеликими порціями при постійному перемішуванні, щоб уникнути локальних зон підвищення концентрації солі в розчині. Після введення останньої порції солі перемішування необхідно продовжити ще 20 – 40 хв до досягнення повної рівноваги між розчиненими і агрегованими білками. Утворення осаду починається із слабого помутніння яке поступово переходить у суспензію із зваженими пластівцями. Процес формування осаду залежить від температури, об'єму рідини рН середовища і може тривати від 20 – 40 хв. до декількох годин.

Осадження ферментів органічними полімерами. Білки можуть агрегуватися без денатурації під дією різних високомолекулярних нейтральних водорозчинних полімерів. Для осадження і виділення ферментів використовуються декстрини і поліетіленгліколь двох типів з молекулярними масами 6000 і 20000. Осадження білків в розчинах ПЕГ схоже з їх осадженням в органічних розчинниках. Так, розчинність ферментів в розчинах ПЕГ зростає при відхиленні рН від їх ізоелектричної точки. Але для проведення осадження потрібні низькі концентрації ПЕГ. Поліетіленгліколь можна додавати у вигляді (50%) водного розчину до вмісту його в суміші 6 – 12%. Процес можна проводити при кімнатній температурі, оскільки ПЕГ має на білок стабілізуючу дію. Сам реактив порівняно дешевий. ПЕГ важче видалити з ферментної фракції, чим сіль або органічний розчинник, але оскільки він не впливає негативно на білок при його подальшому виділенні (висолювання, іонообмінна хроматографія адсорбція і інше), його часто не видаляють зовсім.

Осадження ферментів шляхом вибіркової денатурації. Цей спосіб виділення прийнятний лише для стабільних ферментів, які зберігають

					162.01.15.00 000 ПЗ	4...
За	Ан	Мб докум	Підпис	П		3

стійкість за екстремальних умов. Наприклад, глюкозоізомерази, яка витримує температуру до 90-95°C. Для проведення вибіркової денатурації використовують три фактора: високу температуру, рН і дію органічних розчинників, які можна застосовувати окремо або комбінувати їх.

Термічна денатурація нецільових білків досить часто застосовується на початкових стадіях очищення термостабільних ферментів. Для захисту основного ферменту при термообробці можна використовувати специфічний стабілізуючий ефект субстрату, за присутності якого фермент краще переносить нагрівання. Температурна вибірка денатурація вимагає дотримання умов проведення процесу: температури, тривалість обробки, швидкості охолодження і особливо рН середовища. Цей спосіб частіше використовується в лабораторних дослідженнях і дуже рідко на виробництві.

Вибіркова денатурація під впливом рН – більш розповсюджений прийом очищення і фракціонування ферментів ніж термічна денатурація. Суть методу полягає в тому, що за екстремальних значень рН відбувається денатурація нецільових білків, а цільовий фермент залишається в розчині.

Очистка ферментів методом адсорбції. Ферменти і інші білки здатні адсорбуватися на різних нерозчинних речовинах. Ця властивість використовується для розділення суміші білків і очищення ферментів, особливо в лабораторній практиці для отримання високоочищених і гомогенних ферментів.

Найважливішими адсорбентами білків є різні іонообмінники: гелі фосфату кальцію, гелі гідроксиду алюмінію і різноманітні афінні адсорбенти, які створюються для певного виду ферментів. Незалежно від механізму розділення білків – адсорбції, іонного обміну, вибіркової спорідненості до імобілізованих на носії лігандів – техніка розділення і очищення ферментів майже однакова. Розчин, який містить цільовий фермент, наноситься на колонку, заздалегідь урівноважену розчинником. Потім через колонку пропускають буфер визначеного складу. Елюат, що виходить з колонки,

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн	Ан	Мб доцент	Підпис	Пн		3

збирають по фракціях, які є початковим матеріалом для отримання відповідного ферменту.

Іонообмінна хроматографія. У іонообмінниках білки зв'язуються за допомогою електростатичних сил, що виникають між зарядженими поверхнями білків і щільними кластерами заряджених груп самого іонообмінника. Типові іонообмінники – диметиламіноетилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза – в набряклому стані мають ступінь модифікації до $0,5 \text{ ммоль/см}^3$, що відповідає $0,5 \text{ М}$ концентрації заряджених груп. Ці заряди в колонці нейтралізуються іонами протилежного знаку (іони металів, іони хлору, буфера і т. д.). Звичайно сумарний заряд білка має той же знак, що і протиіон, і білок при проходженні через колонку повинен витіснити саме ці протиіони. Тому для характеристики цього процесу застосовують термін іонний обмін. Білок, як і протиіон, нейтралізує адсорбент, і в місті знаходження білка утворюються нейтральні зони;

Після адсорбції потрібного білка на колонці здійснюється його елюція. Крім афінної елюції теоретично існує два методи елюції білків: зміна рН буфера до величини, при якій зв'язок з білком слабшає; підвищення іонної сили, що спричинює ослаблення електростатичної взаємодії між адсорбентом і білком. Перший метод не завжди дає добрі результати, оскільки при недостатньо високій буферній місткості різка зміна рН в процесі елюції приводить до поганого розділення суміші білків і інших речовин.

Для елюції ферментів другим методом достатньо широко використовують сольові градієнти, звичайно хлориди калію або натрію. У присутності іонів солі сила притягіння між вільним білком і адсорбентом послаблюється і білки починають рухатися до виходу з колонки.

Видалення адсорбованого на іонообміннику або інших неспецифічних адсорбентах ферменту можна здійснити за допомогою афінної елюції. Афінная елюція здійснюється шляхом введення в колонку з ферментом специфічного ліганда, який вибірково зв'язується з адсорбованим білком. При

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ докум.	Підпис	Пол		3

цьому коефіцієнт розподілу різко знижується і білок разом з лігандом видаляється з колонки. Найбільша складність - це знайти ліганд, який би міг впізнати потрібний фермент і зняти його з сорбенту. Якщо елюцію проводять з катіонообмінника, то ліганд повинен мати негативний заряд, а при очищенні на аніонообміннику – позитивний. Якщо ліганд не відповідатиме іонообміннику по заряду, то він може сам адсорбуватися на іонообміннику, і афінна елюція буде сильно ускладнена.

Афінна адсорбційна хроматографія. Її суть полягає в тому, що багато біологічно активних сполук, зокрема і ферменти, мають виняткову здатність специфічно і оборотно зв'язуватись з іншими речовинами, які прийнято називати афінними лігандами. Якщо такий ліганд ковалентно з'єднати з нерозчинною інертною матрицею, то вийде специфічний адсорбент, на якому будуть адсорбуватися лише ферменти, що мають спорідненість до даного ліганду. Решта речовин і білки будуть транзитом проходити через колонку.

Абсолютно специфічним адсорбентом для будь-якого ферменту або білка є антитіла до цього білка, які зв'язані з нерозчинною матрицею. Антитіла характеризуються високою вибірковістю лише до тих білків, проти яких вони були одержані.

Тому при використанні імуноадсорбента можна одержати препарати ферменту чистіші порівняно з іншими типами афінних адсорбентів. Імуноадсорбенти - це спеціалізовані біоспецифічні адсорбенти. Складність отримання антитіл затримує широке впровадження цього способу очищення і виділення ферментів, але технологія отримання моноклональних антитіл може в найближчий час дати розвиток цьому способу очищення ферментів.

У даний момент методика очищення ферментів за допомогою імуноадсорбентів полягає в наступному. Цільовий фермент одержують у високоочищеному гомогенному стані традиційними методами. Для отримання антитіл до ферменту найчастіше імунізують кролика. Далі одержують кров кролика і проводять в ній визначення антитіл. Антитіла з сироватки крові

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ докум.	Підпис	Пол		3

частково очищають, осаджуючи їх сульфатом амонію концентрацією 33% від повного насичення. Потім антитіла приєднують до адсорбенту. Ферментний препарат, що очищається, пропускають крізь адсорбент, при цьому в колонці на антитілах утримується тільки цільовий фермент. Потім колонку промивають від затриманих домішок і здійснюють елюцію адсорбованого на антитілах ферменту.

Мембранні методи очищення ферментів. До мембранних методів очистки належать діаліз, електродіаліз, до баромембранних методів – зворотній осмос, ультрафільтрація, мікрофільтрація і тонка мікрофільтрація.

Розділення розчинених речовин методом діалізу базується на селективній проникності мембран для сполук з різною молекулярною масою.

Діаліз може бути використано для очищення ферментних розчинів від низькомолекулярних сполук (цукри, амінокислоти, мінеральні солі), ступень очистки розчинів сягає 60 – 100%. Діаліз є досить ефективним при високому вмісті в розчинах солей, наприклад після осадження ферментів методом висолювання. В такому випадку можна використати накладання постійного струму на розчин, що діалізується. Тоді при двосторонньому електродіалізі аніони будуть рухатися до аноду, а катіони – до катоду. Однак, електродіаліз не можливо використати при виділенні ферментів, що містять іони металів (амілази, галактозίδαзи), вони, як правило, втрачають активність при електродіалізі.

Для діалізу використовують різноманітні напівпроникні мембрани. Найбільш доступними є пергамент, армований целофан (марлін), різні марки целофанів, а також мембрани, що використовують при ультрафільтрації.

Діаліз дозволяє видалити основну масу низькомолекулярних домішок і підвищити активність ферментних розчинів у перерахунку на суху речовину у 5 – 10 разів. Недоліками цього методу є: можлива втрата активності фермента в результаті вимивання іонів металу чи нестабільності самого ферменту; при діалізі проти звичайної водогінної води може відбуватися втрата активності

					162.01.15.00 000 ПЗ	4..
2..	4..	№ докум.	Підпис	Підп.		4

ферменту внаслідок надходження з води у розчин ферменту іонів металів – інгібіторів ферменту. Необхідно зазначити, що в процесі діалізу відбувається розбавлення розчину ферменту внаслідок проникнення води зумовленого дією прямого осмосу.

Баромембранні методи класифікуються за розміром пор мембран: зворотній осмос ($3 \cdot 10^{-4}$ мкм); ультрафільтрація ($15 \cdot 10^{-5}$ мкм); мікрофільтрація (0,2 мкм); тонка фільтрація (10 мкм).

Зворотній осмос і ультрафільтрація – це перенос молекул під тиском вище осмотичного, при якому розчинник (вода) проходить крізь мембрану, а розчинена речовина в залежності від її молекулярної маси частково або повністю затримується. Швидкість ультрафільтрації буде тим вищою чим вища різниця між робочим тиском і осмотичним.

Стабілізація та стандартизація ферментних препаратів.

Стандартизація і стабілізація ферментних препаратів мають велике значення в процесах їхнього виробництва, зберігання і використання. Стандартизацією називають процес отримання препаратів з певною ферментативною активністю.

Досить часто ферментативна активність партії готового препарату помітно відрізняється від попередніх. Споживач же повинен отримувати препарат з певною стандартною активністю. Тому на підприємстві на основі тривалого аналізу продукції, що випускається, встановлюють стандартний рівень активності із запасом 20 – 30%.

Стандартизація ферментного препарату – доведення активності ферменту до стандартів, відповідно вимогам ДСТУ, ТУ. Для цього використовують різні нейтральні наповнювачі – крохмаль, лактоза. Важливо, щоб наповнювач був стосовно ферменту стабілізатором, а не просто інертною речовиною. Необхідно також враховувати здатність наповнювача до сорбції водних парів. Наприклад, крохмаль та лактоза запобігають зволоженню ферментного препарату, а хлориди калію і натрію сприяють зволоженню, тому

					162.01.15.00 000 ПЗ	4..
2..	4..	№ докум.	Підпис	Підп.		4

у разі їх використання необхідна герметична упаковка ферментного препарату. При змішуванні готового сухого препарату з наповнювачем необхідно, щоб вони мали однаковий ступінь подрібнення і вологість не більше 10 – 12%.

Кількість наповнювача можна розрахувати за формулою:

$$S = (a \cdot b) / c - b,$$

де S – кількість наповнювача, необхідна для отримання стандартного за активністю препарату, кг; a – активність вихідного препарату, од.ФА/г; b – кількість вихідного препарату, кг; c – стандартна активність препарату, од.ФА/г.

Стандартизація препарату хлористим натрієм і крохмалем в рівних кількостях дозволяє зберігати його без втрат до двох років.

2.3 Загальна характеристика використання та виробництва глюкооксидази

Глюкооксидаза належить до класу оксидоредуктаз. Субстратом цього ферменту є глюкоза. Під дією ферменту глюкоза перетворюється на глюконову кислоту. При цьому виділяється перекис водню. На цьому явищі засноване застосування глюкозооксидази як антисептичного засобу. Так, препарат «Мікроцид» випускається львівським підприємством «Львівдіалек». Це прозора стерильна рідина зі слабким зеленувато-жовтим відтінком, рН 3,0 – 4,5. Мікроцид містить не менше 40 ОД/мл (за одиницю активності приймають антимікробну активність 1 мкг глюкозооксидази). Діє на грампозитивні і грамнегативні мікроорганізми. Застосовують для лікування інфікованих ран, виразок, опіків.

Крім того, глюкозооксидаза використовується в якості реактиву для визначення мікродоз глюкози. Глюкоза під дією ферменту розщеплюється до

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зна	Ан	№ документа	Підпис	Пос		4

глюконової кислоти і перекису водню, який в свою чергу змінює колір біхромату калію з безбарвного до жовтого. Інтенсивність забарвлення вимірюють на ФЕК, вона є прямо пропорційною до кількості глюкози.

Технологічні особливості отримання – використовують як поверхневий, так і глибинний спосіб культивування. До числа мікроорганізмів-продуцентів належить гриб *Penicillium vitale* Pidoplitschko et Bilaj (*P. vitale*) з класу *Ascomycetes*, родини *Aspergillaceae*, роду *Penicillium*.

При культивуванні в залежності від співвідношення в середовищі кількості глюкози та нітрату калію утворюється або глюкозооксидаза, або каталаза. При високому вмісті глюкози і низькому нітрату калію в середовищі синтезується глюкозооксидаза. Але при будь-якому співвідношенні нітрату калію і глюкози синтезуються обидва ферменти.

Для отримання очищеного препарату використовують сорбцію на окисі алюмінію. Глюкозооксидаза повністю сорбується на окисі алюмінію, на цьому і базується її видалення. Сорбований на окисі алюмінію фермент виймається і проводиться десорбція. Подальше видалення здійснюється з використанням органічних розчинників. Осаджують фермент ацетоном при низьких температурах і використовують центрифугування для видалення осаду.

На рисунку 2.2 наведено схему отримання препарату «Мікроцид». Даний метод дозволяє отримати препарат виключної специфічності до глюкози без домішок каталази.

Для медичних цілей отримують кристалічні препарати цього ферменту.

Отримання кристалічних препаратів глюкозооксидази.

Глюкозооксидазу в кристалічному вигляді можна отримати з водних розчинів очищеної глюкозооксидази за допомогою сірчаноокислого амонію при додаванні його до кінцевої концентрації у розчині 52-55% насичення. Для цього до 2,5-3,0% водного розчину глюкозооксидази повільно додають при перемішуванні тонко розтертий порошок сірчаноокислого амонію до вказаного насичення. При досягненні такого насичення утворюється невелика стійка

Культуральна рідина
P.vitale

репарат Мікроцид)

Елюція ферменту амонійфосфатним буфером (9% H_4C на 0,3М KH_2PO_4 , 20-30 хв)

Відділення елюату за допомогою воронки

Препарати

Повторна елюція тим же розчином,
розведеним в 2 рази

Етиловий спирт
-10С

Осаждения ферменту з об'єднаного елюату подвійним об'ємом етилового спирту при 0С

ферменту до глюкози
налітичного засоб для
промисловості препарати

Відділення осаду на центрифугу при 4000-5000 об./хв

друге – необхідне
невеликих кількості

Розчинення осаду в льодяній воді і
відділення нерозчинного залишку
центрифугуванням

вино, фруктові соки, майонез).

Ацетон -10С

Подвійне осадження ферменту із розчину ацетоном при 0С і відділення осаду центрифугуванням

Розчинення осаду в воді і висушування методом ліофілізації

3 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

3.1 Характеристика готового продукту

Об'єктом кваліфікаційної роботи є харчовий фермент Глюкооксидаза.

В Україні єдиний виробник цього ферменту для потреб харчової промисловості мікробним синтезом - компанія «Ензим».



Рис. 3.1 - Торгова форма препарату Глюкооксидази виробник компанія «Ензим Biotech»

Глюкозооксидаза ENZIM фермент, який каталізує окислення глюкози з утворенням перекису водню і глюконової кислоти.

Фермент Глюкозооксидаза ефективно застосовується в борошномельної і хлібобулочної промисловості, для поліпшення якісних характеристик борошна і тіста.

Особливості застосування:

- Дозування залежить від сировини і технологічного процесу.
- Швидкість окислення глюкози залежить від наявності кисню в субстраті і концентрації самого субстрату.

Препаративна форма:

- Суха.

Упаковка:

- Пакет Zip-Lock: 1 кг;
- Банка пластикова: 100 г.

Умови зберігання:

Зберігати за температури від -25 °С до +20 °С в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці.

Термін придатності:

12 місяців.

Глюкооксидаза (КФ. 1.1.3.4). Фермент є флавопротеїдом, в якому білок сполучений з двома молекулами ФАД (рис. 3.2).

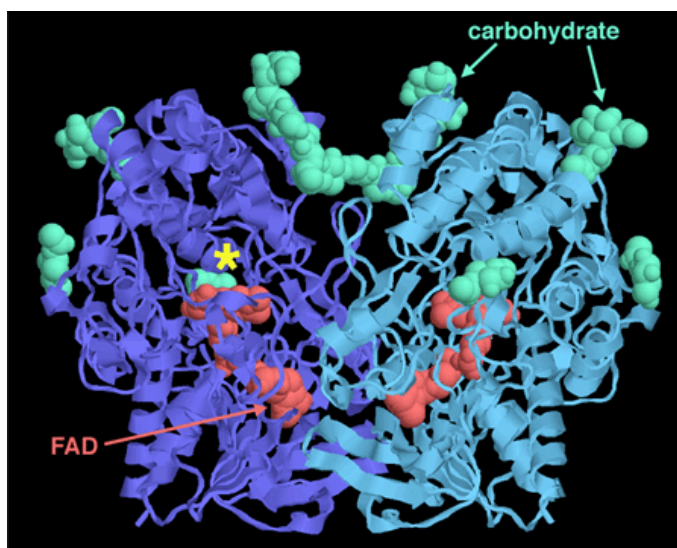


Рис. 3.2 - Четвертинна структура глюкооксидази

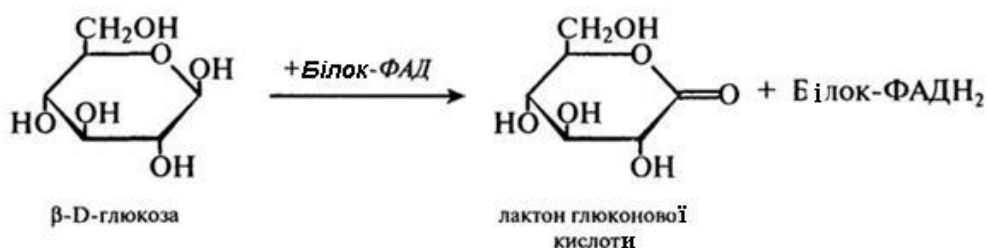
Він окислює глюкозу з утворенням в кінцевому випадку глюконової кислоти і має практично абсолютну специфічність по відношенню до глюкози.

Сумарне рівняння має наступний вигляд:



Представлений вище процес насправді відбувається в декілька стадій:

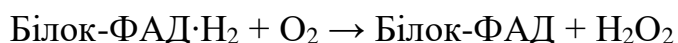
1-я стадія:



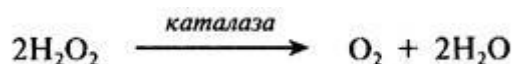
2-я стадія:



3-я стадія:



4-я стадія:



На першому етапі цієї реакції відбувається видалення двох атомів водню у першого вуглецевого атома глюкози. Таким чином утворюється відновлений флавіновий фермент і лактон глюконової кислоти. Далі відновлений фермент реагує з киснем повітря, і утворюється пероксид водню. Токсичний пероксид водню розщеплюється каталазою на кисень і воду, а β-О-глюконо-δ-лактон піддається спонтанному розщепленню з приєднанням води, внаслідок чого утворюється глюконова кислота.

У харчовій технології глюкозооксидазу використовують спільно з каталазою, оскільки необхідно розкласти пероксид водню, що утворюється на першій, ферментативній стадії окиснення глюкози глюкозооксидазою.

Високоочищені препарати глюкозооксидази отримують з цвілевих

грибів роду *Aspergillus* і *Penicillium*. Вони мають приблизно однакову молекулярну масу ≈ 150 кД, ІЕТ – 4,2...4,3 і оптимум рН 5,6, стабільний в зоні рН 3...7, за температури до 50 °С. Інгібітори – іони Гідраргіруму, Купруму, стабілізатори – іони Кальцію й амонію.

Останніми роками глюкозооксидаза отримала широке застосування. Завдяки винятковій специфічності препарати глюкозооксидази застосовуються як аналітичний засіб для кількісного визначення глюкози.

Окрім цього, препарати глюкозооксидази знайшли застосування в харчовій промисловості для таких випадків:

– для видалення слідів глюкози, що є необхідним під час обробки харчових продуктів, якість і аромат яких погіршуються через те, що в них містяться відновлюючі цукри; наприклад, в отриманні з яєць сухого яєчного порошку (мається на увазі реакція Майяра, так як глюкоза під час висушування і зберігання яєчного порошку, особливо за підвищеної температури, легко вступає в реакцію з групами амінів амінокислот і білків в наслідок чого порошок темніє, і утворюється ряд речовин з неприємним смаком і запахом);

– для видалення слідів кисню, що є необхідним під час обробки продуктів, в яких тривала присутність невеликих кількостей кисню призводить до зміни аромату і кольору (пиво, вино, фруктові соки, майонез). Внесення пакетиків, що містять суміш води, глюкози, ферменту і буферу, сприяє видаленню кисню з повітряного простору. В усіх подібних випадках у ферментну систему включають каталазу, яка розкладає H_2O_2 , що утворюється під час реакції глюкози з киснем. Цей метод знайшов широке застосування в США для видалення кисню з банок з сухим молочним порошком.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
						5
2..	Ан	№ документа	Підпис	Підпис		

3.2 Характеристика сировини та матеріалів

Перелік сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються при виробництві ферментного препарату, наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 - Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НД	Показники НД, обов'язкові для перевірки	Функціональне призначення	Додаткові показники, рекомендовані для перевірки	Примітка
1	2	3	4	5	6
1.Основна сировина					
Кукурудзяний екстракт	ТУ У 18.243-95	зовнішній вигляд, масова доля сухих речовин, кислотність, масова доля азота, біологічна перевірка	Компонент поживного середовища		Для приготування поживного середовища
Глюкоза кристалічна	ГОСТ 6038-79	зовнішній вигляд, маркіровка, питома обертання, домішки	-//-	-	-//-
Крейда хімічна	ГОСТ 8253-79	зовнішній вигляд, маркіровка, доля основної речовини, домішки	-//-	-	-//-
Нітрат амонію	ГОСТ 2-85	зовнішній вигляд, колір, маркіровка, вміст основної речовини, домішки	-//-		-//-
Калію однозаміщений фосфорнокислий	ТУ 6-09-5324-87	зовнішній вигляд, маркіровка, вміст основної речовини, домішки	-//-		-//-
<i>Penicillium vitale</i>		Морфологічні, серологічні, культуральні властивості, чистота культури, ферментативна активність	Продуцент ферменту		Для біосинтезу ферменту

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4	5	6
2. Допоміжні речовини					
Вугілля активоване	ГОСТ 4453-74	зовнішній вигляд, адсорбційна активність, оптична щільність	сорбент	-	для процесів абсорбції
Вода очищена	ДФУ 1.1	pH, зовнішній вигляд	розчинник, миючий засіб	-	для приготування живильного середовища
Масло рослинне	ГОСТ 1129-93	зовнішній вигляд, маркіровка	піногасник	-	в процесі ферментації
3. Матеріали					
Папір фільтрувальний	ГОСТ 12026-76	зовнішній вигляд, маркіровка	фільтр. матеріал	-	для фільтрації
Папір пергаментний	ГОСТ 1341-97	зовнішній вигляд, маркіровка, цілісність, жаростійкість	пакувальний матеріал	-	для підготовки інвентарю
Вата біла медична гігроскопічна	ГОСТ 5556-75	без віскозних включень, зовнішній вигляд, маркування	матеріал, що фільтрує	-	для виготовлення пробок і для проведення аналізів
Марля	ГОСТ 9412-93	зовнішній вигляд, маркування, цілісність	матеріал, що фільтрує, матеріал для проведення аналізів на мікробну контамінацію	-	для виготовлення пробок і фільтрації розчину
Пакети		зовнішній вигляд, цілісність	Для пакування		Для пакування препарату
4. Напівпродукти					
фермент розчин	За регламентом	Ферментативна активність, ідентифікація	на сушку		
фермент порошок	За регламентом	Ферментативна активність, ідентифікація, остаточна волога	на розфасовку		

3.3 Характеристика біологічних агентів

Високоочищені препарати глюкозооксидази отримують з цвілевих грибів роду *Aspergillus* і *Penicillium*. Продуктивність позаклітинної глюкозооксидази виявлена у майже всіх штамів, що належать до роду *Penicillium*, за винятком одного виду із роду *Talaromyces*.

Глюкозооксидаза була вперше виділена з клітин *Aspergillus niger* Мюллером. Фермент був також екстрагований з *Aspergillus niger* Franke та Definer. Про продукцію глюкозооксидази видами *Penicillium* повідомляли Мюллер та Coulthard. Частіше зустрічаються відомості про виробництво глюкозооксидази з клітин видів *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger* та *Aspergillus fumigatus*.

До недавнього часу більшість комерційно виробленої глюкозооксидази в світі була виділена з міцелію *Aspergillus niger*, вирощеного головним чином для виробництва глюконової кислоти або її солей, таких як глюконат натрію або глюконат кальцію. Відповідно фермент був отриманий по суті як побічний продукт виробництва глюконату. Але поточні ринки глюкозооксидази часто вимагають більшої кількості цього ферменту, ніж можна зручно та економічно отримати від ферментації, що проводиться в основному для виробництва глюконату, саме тому в промислових масштабах для отримання глюкооксидази можуть використовувати інші високопродуктивні штами або використовувати штами *Aspergillus niger* на середовищах для максимального накопичення ферменту.

На сьогодні одним із найкращих продуцентів глюкозооксидази є штам *Penicillium purpurogenum* (синонім *Talaromyces purpurogenus*) № 778, який був виділений із природного джерела.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
2..	Ан	№ докум.	Підпис	Підп.		5

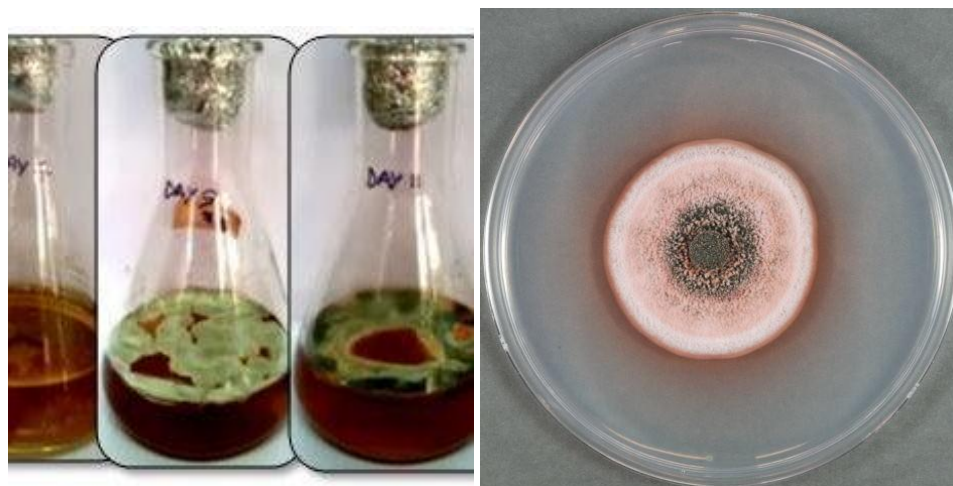


Рис. 3.3 - Культивування *Penicillium purpurogenum* у рідкому та густому живильному середовищі

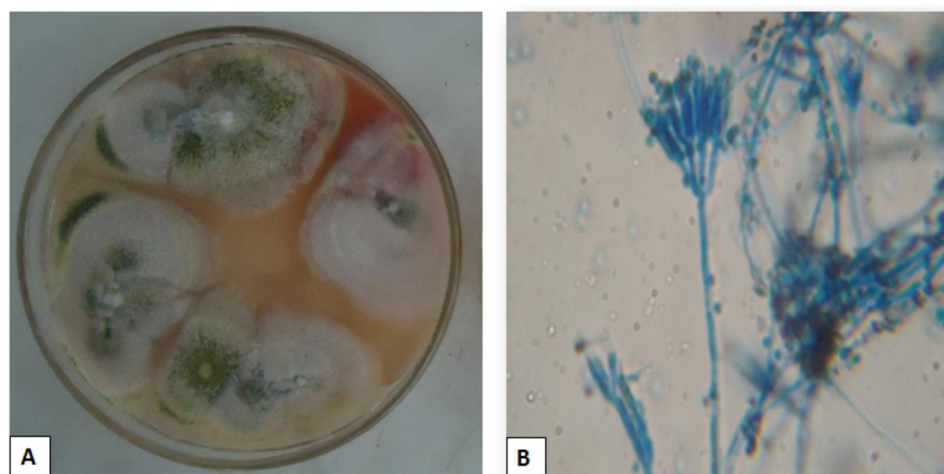


Рис. 3.4 - Мікроскопія *Penicillium purpurogenum*, що виріс на густому живильному середовищі Чапека

Talaromyces purpurogenus (лат.) - Вид недосконалих грибів (телеоморфна стадія невідома), що відноситься до роду Талароміцес (*Talaromyces*). Раніше включався до складу роду Пеніцилл (*Penicillium*).

Колонії на агарі Чапека обмежено-зростаючі, на 7-му добу 1,5-2,5 см в діаметрі, бархатисті до майже пухнастих, з жовтим або оранжево-червоним малопомітним міцелієм, по краю білим. Спорonoшення рясне, в темно-зелених тонах. Ексудат іноді рясніший, оранжево-червоний. Реверс темно-червоний до фіолетового, що виділяється в середовище, пігмент криваво-червоний до

фіолетово-червоного.

Колонії на СҮА на 7-му добу 2-2,5 см в діаметрі, радіально-складчасті, з білим і червоним міцелієм, шерстисті, зі скудним до рясного спороношенням у темно-зелених тонах. У середовищі виділяється яскраво-червоний пігмент. Ексудат відсутній. Реверс колоній темно-коричневий до фіолетово-коричневого.

На агарі з солодовим екстрактом (МЕА) колонії з білим і світло-жовтогарячим міцелієм, в центрі трохи підняті, бархатисті і шерстисті. Спороношення рясне, темно-зелене, іноді відсутнє. Реверс коричнево-жовтий або коричнево-жовтогарячий. Розчинний пігмент у середовище не виділяється.

На агарі з дріжджовим екстрактом і сахарозою (YES) колонії з білим і світло-жовтогарячим міцелієм, з рясним темно-зеленим або сіро-зеленим спороношенням. Розчинний пігмент не виділяється, реверс колоній у центрі коричневий, з обох боків до світло-жовтого, зрідка темно-червоний або червоно-коричневий.

Конідіоносці - двоярусні китиці, з гладкостіною ніжкою 70-200 мкм довжиною і 1,5-3 мкм товщиною. Метули в мутовці по 3-5, що розходяться, 12-15 мкм завдовжки. Фіаліди голкоподібні, по 3-6 у пучку, 12-14 × 3 мкм. Конідії широкоеліпсоїдальні, гладкостінні, 3-3,5 × 2-2,5 мкм.

Відмінність від близьких видів. *Talaromyces purpurogenus* виділяє червоний розчинний пігмент СҮА при 25-30 °С. *Talaromyces atroroseus* відрізняється темно-зеленим спороношенням та шорсткими конідіями. *Talaromyces ruber* відрізняється швидким зростанням на більшості середовищ і червоним реверсом на МЕА.

Екологія та значення. Переважно ґрунтовий гриб, що зрідка зустрічається як забруднювач на різних органічних субстратах.

Продуцент токсинів рубратоксину А, рубратоксину В, пурпурогенону. Може спричинити серйозні харчові отруєння людини, описані випадки

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн.	Ан.	Мб. доцента	Підпис	Пп		5

отруєння свиней, худоби, птиці ураженою кукурудзою.

На підприємстві «Ензим» останні роки використовують *Penicillium vitale* *Pidopl. Et Bilai*, перевагою використання якого є те, що залежно від складу живильного середовища, він є продуцентом двох важливих промислових ферментів - окрім глюкооксидази, ще і каталази, який на підприємстві випускається у рідкому виді і відноситься до технічних ферментів.

Препарати каталази широко застосовуються в тих випадках, коли потрібно повністю видалити перекис води. Насамперед у м'ясний промисловості розроблений метод використання препарату каталазу *P.vitale* для усунення залишків H_2O_2 після освітлення крові, темних технічних жирів, що є ефективним і економічно-вигідним прийомом, що дозволяє підвищити його сорт. Використання глюкооксидази з каталазою в якості антиоксиданту дає можливість збільшити термін зберігання топленого свинячого жиру в герметичній упаковці за температури 20-20 °С на розсіюваному світлі – до 24 місяців, яловичого за температури 37 °С – до 12 місяців, сприяє захисту від руйнування протягом термінів зберігання таких біологічно-цінних речовин, як лінолева, ліноленова і арахідонова жирні кислоти, а в яловичому жирі, крім цього, ще й каротиноїдів. Каталаза перешкоджає прогірканню ковбасу при довгому зберіганні. Оскільки внесення ферменту в готовий продукт неможливо, а на стадії приготування фаршу - досить проблематично (у зв'язку з ймовірною інактивацією під час копчення), доречно додавати бактеріальні добавки, що дозволяють рівномірно розподілити фермент по ковбасі.

У молочній промисловості каталазу використовують разом з пероксидом водню, що дозволяє виключити процес пастеризації, який проводиться з метою інактивації патогенної мікрофлори. В результаті пастеризації частково втрачаються природні ферменти молока. Пероксид водню в концентрації 0,2% - 0,3% від об'єму молока виконує функції дезинфікатора, суттєво не впливаючи на ферменти молока (ліпазу, протеазу, фосфатазу). Додавання каталази інактивує залишки перексиду водню в молоці [3].

Препарат ефективний при відбілюванні хутра, тканини, в органічному синтезі, при стерилізації бактеріальних середовищ, а також для одержання дозованої кількості кисню, при виготовленні деяких пористих матеріалів, а також у наукових дослідженнях та моніторингах, де вивчають супероксид та перекиси води в тому чи іншому процесі. Перспективним є використання препарату разом із супероксиддисмутазою в медицині та косметології.

Каталазу (в комплексі з глюкозооксидазою) часто використовують у виноробстві, пивоварінні, консервній, соковій і безалкогольній промисловості для видалення кисню, що дозволяє підвищити стійкість продукції до тривалого зберігання та зберегти кольоровість продукту [10].

Культивування грибів здійснюється на середовищі наступного складу (в г): KNO_3 - 8; K_2HPO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, - на 1 л середовища, при додаванні цукру та кукурудзяного екстракту в наступних співвідношеннях: для *P. vitale* - 6 % цукру і 2 % кукурудзяного екстракту; для *P. verruculosum* - 8 % цукру і 2 % кукурудзяного екстракту; для *P. canescens* - 6 % цукру і 3 % кукурудзяного екстракту.

Інокулят готують із культурою на сусло-агарі при посіві на середовищі Білай з 4 % цукру та 3 мг/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, культивування протягом 48 год, у ферментативному середовищі містить 15 % інокулята. Тривалість ферментації становить 7 днів.

Типова культура *Penicillium vitale* Pidoplichko et Bilai apud Bilai 1961 ВКМ F-3624, єдиний представник виду *P. vitale*, ідентифікований в Інституті вірусології ім. Д. К. Заболотного. З 1950 р. культура використовувалась для отримання рідкого препарату Мікроцида, якому властиві антибіотичні властивості, а в подальшому для отримання ферменту глюкозооксидази. Пізніше із культуральної рідини гриба стали отримувати каталазу – гемвмісний фермент, що розкладає перекис водню.

Мицелій добре розвинутий, септований. Колонії ростуть повільно, спочатку білі, потім зелено-голубі, бархатні, дрібно пухнасті, вкриті

					162.01.15.00 000 ПЗ	4...
За...	А...	№ докум...	Підпис...	П...		5

жовтуватими дрібними каплями, зі складками, досить широким білим краєм, з часом набувають брудно-сірого кольору. Зі зворотної сторони колонії спочатку солом'яно-жовті, потім жовто-коричневі. Діаметр колоній 17 - 20 мм за 7 діб. Пігмент в середовище не виділяється (рис. 3.5).

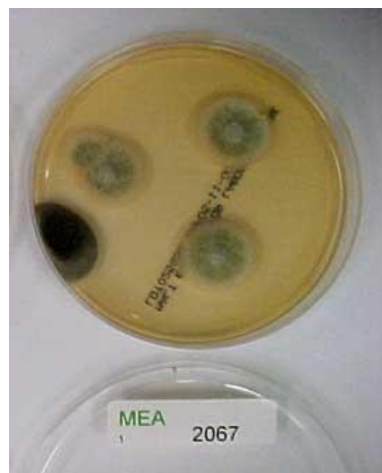


Рис. 3.5 - Колонії *Penicillium vitale* Pidoplichko et Bilai apud Bilai на твердому живильному середовищі

Конідієносці 250-300 x 2-3,5 мкм, з одномутовчастою чи двоярусною кісточкою. Вітки більшої частини 10-15 x 2-3 мкм, фіаліди бутильчасті 6-8 x 2-3,5 мкм. Конідії еліптичні, часто яйцевидні, з віком можуть бути майже кулеподібними, 2,5-3 x 2-2,5 мкм [2, 4].

У *P. vitale* катаболізм ростового субстрату здійснюється за гліколітичним шляхом (шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса), про що свідчить висока активність ключового ферменту фосфофруктокінази. Наявність 2-оксоглутаратдегідрогеназної активності свідчить про повноцінне функціонування циклу трикарбонових кислот. Пентозофосфатний цикл служить постачальником НАДФН для реакцій конструктивного метаболізму і рибози, для синтезу нуклеотидів [2].

Встановлено, що *P.vitale* інвертує сахарозу та глюкозу в високих концентраціях, але з невеликою швидкістю. При додаванні суміші мікроелементів в середовище відбувається пригнічення активності інвертази. Використання вищих цукрів та полісахаридів йде через гідроліз їх до гексоз,

що відбувається під дією відповідних ферментів (амілаза, цитраза та інш.). Використання вуглеводів як джерела карбону, часто супроводжується кислотним бродінням.

P. vitale добре використовує як джерело нітрогену білки, які при цьому піддаються гідролізу (протеолітичні ферменти). Серед інших джерел азоту можна вказати амінокислоти (наприклад аспарагін), і особливо солі амонію та нітрати.

Крім карбону та нітрогену потрібні ще наступні елементи: Р (фосфати), S (сульфати), К, Mg, Fe, Zn. Також потрібні мікроелементи [8]. Мікроелементи відіграють важливе значення в обміні речовин грибної клітини, приймаючи участь в ферментативних реакціях синтезу нуклеїнових кислот, в азотному обміні, гліколізі, окисно-відновних реакціях та ін. Завдяки поліфункціональності мікроелементів, їм належить важливе значення в живленні грибів.

В дослідженні впливу мікроелементів на ріст *P. vitale* було встановлено вплив певних мікроелементів і їх суміші на кислотність поживного середовища (рН), активність глюкозооксидази, каталази та інвертази в культуральній рідині *P. vitale*, а також утворення в середовищі ФАД-флавінаденіндинуклеотида, що входить до складу молекул глюкозооксидози та коферментних вітамінів.

Внесення в середовище катіонів Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ; Fe^{2+} , PO_4^{2-} викликає підвищення глюкозооксидазної активності, прискорює накопичення ФАД в середовищі. Із іонів металів марганець спонукає до накопичення в культуральній рідині *P.vitale* глюкозооксидози, ФАД та інвертази. Цинк стимулює ріст *P.vitale* і каталазну активність, проте інгібує утворення глюкозооксидози та ФАД в культуральній рідині. Відмічена також пряма залежність між ростом гриба та накопичення каталази в середовищі, що свідчить про те, що виділення екзоензима пов'язано з синтезом білка ферменту, а не з автолізом клітини [10].

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
За	Ан	№ докум.	Підпис	Пол		6

Внутрішньоклітинні коферментні вітаміни є будівельним матеріалом для синтезу коферментів і ферментів, що забезпечують біосинтетичні процеси в клітині. Вміст коферментних вітамінів при вирощуванні гриба за «каталазним» циклом вища, ніж при вирощуванні його за «глюкозооксидазним» циклом.

P.vitale є хемоорганогетеротрофом. Як і більшість інших грибів *P. vitale* віддає перевагу кислому середовищу. Необхідно відмітити, що утворення глюксооксидази супроводжується підкисленням середовища до рН 3,0-3,2, в той час на середовищах з сумішшю мікроелементів чи з додаванням одного цинку рН середовища змінюється в сторону основи, що стимулює синтез каталази .

По відношенню до кисню *P. vitale* аероб. У зв'язку з аеробністю міцелій розвивається переважно у верхніх шарах субстрату і не проникає в його глибину. Цей факт тісно пов'язаний з відношенням до води. Необхідність у воді *P. vitale* дуже висока, але насичення водою пористого субстрату (наприклад розвареного зерна) небажане, тому що при цьому повітря витісняється із пор і всередині створюються анаеробні умови. При меншому насиченні гриб проникає глибше і тримається довше на такому субстраті [8].

Температурним оптимумом для культивування гриба є 25 °С, мінімумом - 15 °С, максимумом - 35 °С, за температури 37 °С - ріст відсутній.

Для розвитку продуцента світло не має особливого значення. Розвиток спостерігається як в темноті, так і на розсіяному світлі [4, 8].

Характерні способи розмноження - вегетативне та безстатеве розмноження конідіями. Статевого процесу немає, або він не виявлений [11].

4 ТЕХНОЛОГІЧНІ РОЗРАХУНКИ

Виробництво ферментного препарату «Глюкооксидаза» відбувається у виробничих цехах підприємства «Ензим». Живильні середовища готують у загальновиробничому цеху виробництва живильних середовищ, вирощування штаму - у цеху ферментації, отримання сухого препарату - у відділенні виділення та сушки.

Вирощування штаму *P. vitale* відбувається з суворими правилами асептики через можливість зараження їхніми спорами інших виробничих приміщень підприємства.

Основними типами обладнання у виробництві препарату є: реактори для приготування живильних середовищ - у цеху виробництва живильних середовищ; інокулятори та біореактори - у цеху ферментації; екстрактори та сушарки - у відділення виділення препарату.

Біореактори є апаратами, в яких проходять процеси мікробіологічного синтезу. Апарати можуть працювати як у періодичному, так і у безперервному режимі.

При цьому обладнання для безперервних процесів може відноситися як до реакторів ідеального змішування, так і до ідеального витіснення. Така різноманітність конструктивних рішень потребує використання різних математичних моделей та методів для розрахунку подібних реакторів. Однак у тому випадку, коли в наявності є дані про масообмінні, теплообмінні та інші процеси, що проходять в біореакторах, завданням розрахунків є визначення обсягу апарату виходячи із загального часу виробничого циклу. Розрахований за наведеною нижче методикою обсяг біореактора використовується для вибору конкретного апарату зі стандартного ряду або з каталогів виробників.

Ще однією важливою особливістю біореакторів для проведення аеробних процесів є використання кисню, що забезпечує дихання

					162.01.15.00 000 ПЗ	4
2	4	Мб	Підм	Пл		6

мікроорганізмів. Типові витрати чистого кисню на дихання лежать у діапазоні 1–4 мг/л хв., що змушує конструкторів застосовувати спеціальні методи подачі газу у біореактор. Для цього необхідно підібрати барботери, повітряні фільтри, компресори та інше обладнання.

Вихідними для проектування всіх цих систем є визначення середньої витрати газу в процесі мікробіологічного синтезу.

В основі класифікації біореакторів лежать процеси, що у них відбуваються. По відношенню до кисню повітря всі мікроорганізми поділяються на аеробів та анаеробів, відповідно, процеси їх культивування бувають аеробним та анаеробним.

Саме культивування можна проводити різними способами: у розчині (глибинне культивування), на поверхні рідкої або твердої фази (поверхневе або твердофазне культивування). Відповідно до цього розрізняються і конструкції біореакторів. Найбільшого поширення у промисловості знайшли біореактори для глибинного аеробного культивування, оскільки вони забезпечують максимальну продуктивність при мінімальному обсязі перероблюваних сумішей. Основними типами таких реакторів є:

- реактори з механічним перемішуванням;
- реактори з пневматичним перемішуванням;
- газовихреві біореактори;
- аерліфтні біореактори;
- мембранні біореактори.

Гриби роду *Penicillium* відносяться до аеробних організмів, тому після етапів масштабування вони передаються до біореактору, що облаштований системою аерації. Крім цього біореактор оснащений системою перемішування. На підприємстві застосовують типові апарати з механічним перемішуванням.

Реактори з механічним перемішуванням представляють собою ємнісні апарати з мішалкою, типові для хімічної промисловості. Подача кисню в

					162.01.04.00 000 ПЗ	4
2..	4..	Мб. доц.	Підпис	П.		6

реактори такого типу здійснюється за допомогою трубок для невеликих за об'ємом апаратів або барботерів для середнього обладнання (до 10 м³) обсягу. Для насичення культуральної рідини киснем використовують також тонкоплівкові технології, засновані на стіканні розчинів або суспензій розвиненою поверхні апарату. У цьому випадку більша питома поверхня забезпечує інтенсивний газообмін. Однак ефективність подібних рішень різко зменшується зі збільшенням обсягів обладнання понад 10 м³. Труднощі, що виникають при забезпеченні інтенсивного масообміну в реакторах великого об'єму за допомогою механічних мішалок, обмежують застосування цього типу біореакторів у великотоннажних виробництвах. При розрахунку подібних біореакторів спочатку розраховують час виробництва циклу, що складається з тривалості масообмінних, теплообмінних процесів та самого процесу культивування мікроорганізмів. У разі апаратів періодичної дії до цього часу необхідно додати тривалість завантаження та вивантаження культуральної рідини, а також час, необхідний для підготовки біореактора до наступного завантаження.

Потім, виходячи з необхідної продуктивності, готового продукту розраховують номінальний обсяг біореактора. Останньою стадією розрахунку обсягу апарату є вибір найближчого більшого значення із стандартного ряду ємнісного обладнання чи каталогів виробників. Розрахунок витрати газу реакторах цього типу ведеться з урахуванням мінімального тиску, який буде необхідний подолання опору стовпа рідини у реакторі. При цьому вибирають мінімальне значення коефіцієнта витрати газу, оскільки масообмін забезпечується механічною мішалкою, а газ подається для дихання.

Важливим обладнанням при виробництві термолабільних речовин, до яких відносяться ферментні препарати, є сушильне обладнання.

У роботі запропоновано замінити сушарку на 500 кг на вакуумну сушарку FD-100-CIP з більшою завантажувальною камерою на 1000 кг, що дозволить скоротити витрати часу на процес сушіння та витрати сировини.

					162.01.15.00 000 ПЗ	4..
2..	4..	№ докум.	Підпис	П.р.		6

Одержання біопрепаратів, що містять життєздатні мікроорганізми, засноване на здатності мікроорганізмів при зневодненні припиняти помітну життєдіяльність на тривалий час та відновлювати її при наступному обводненні. Такий стан, коли метаболізм оборотно загальмований чи зупинений, називають анабіозом.

Завдання отримання біопрепаратів, що містять життєздатні мікроорганізми, на перший погляд здається простим. Мікроорганізми, виділені з культуральної рідини, необхідно висушити до певної вологості, в деяких випадках поєднати з наповнювачем або стабілізуючими добавками та розфасувати у зручну для зберігання та застосування тару. Однак під час зневоднення біомаси у клітинах відбуваються суттєві зміни. Ці зміни можуть призвести до утворення нових небажаних сполук, інактивації біологічно активних речовин і порушення життєздатності клітин.

При сушінні видаляється позаклітинна та внутрішньоклітинна вода. Причому якщо видалення з біомаси позаклітинної води протікає порівняно легко, то для відділення води, пов'язаної з компонентами біомаси, потрібно значно більше енергії і необхідно підвищувати температуру сушіння, яка обмежується термостійкістю мікроорганізмів.

Основна вимога до технології зневоднення мікроорганізмів – це збереження їх життєздатності. Оскільки всі мікроорганізми є термолабільними, їх сушіння слід проводити в м'якому режимі, тобто при невисокій температурі і невеликій тривалості.

Сублімаційне (ліофільне, молекулярне) сушіння – це сушіння матеріалів у замороженому стані під вакуумом. При цій сушці перебуває в матеріалі волога перетворюється на пару, минаючи рідкий стан, тобто, сублімує. Сублімаційна вакуумна сушка поєднує переваги двох технологій: заморожування та видалення вологи. При сублімаційному сушінні мікробіологічних об'єктів обов'язково суворе дотримання асептичних умов та техніки безпеки.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зн.	Ан	№ докум.	Підпис	Підп.		6

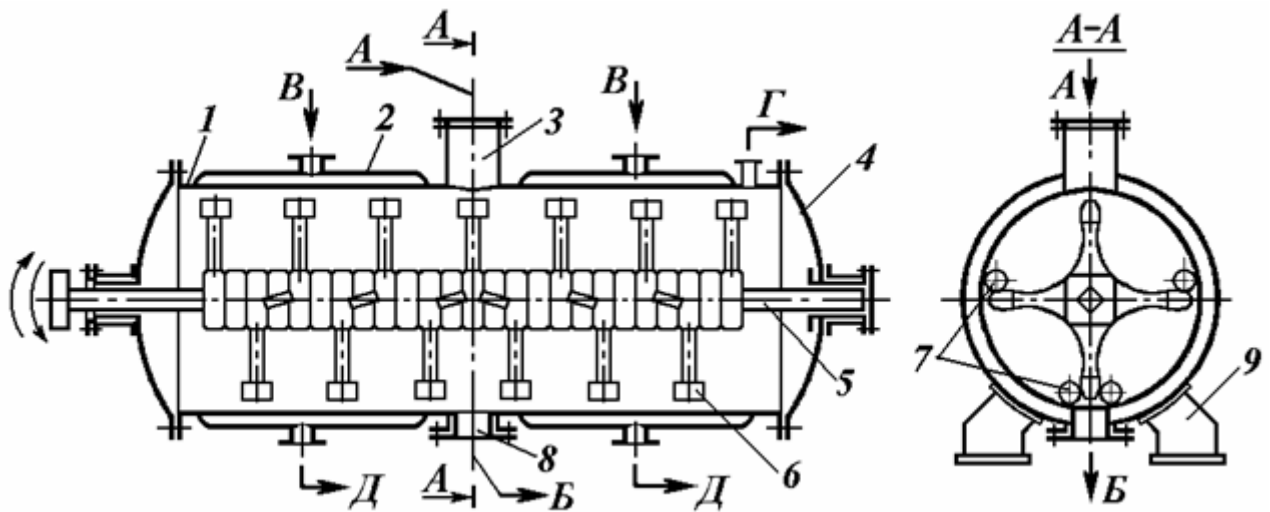


Рис. 4.1 - Загальний вигляд гребкової вакуум-сушарки:

1 – корпус; 2 – парова сорочка; 3 – люк завантажувальний; 4 – кришка; 5 – вал; 6 – гребки; 7 – труби-качалки; 8 – люк для вивантаження; 9 – опора; Потоки: А – вологий матеріал; Б – висушений матеріал; В – пара насичена; Г – пара волога; Д – конденсат водяної пари

5 СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ТА ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Біологічна схема

Біологічна схема вирощування штаму *Penicillium vitale* *Pidoplichko et Bilai apud Bilai* наведена на рис. 5.1.



Рис. 5.1 - Біологічна схема виробництва ферментного препарату
ГЛЮКООКСИДАЗИ

5.2 Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва ферментного препарату глюкооксидази наведена на рис. 5.2.



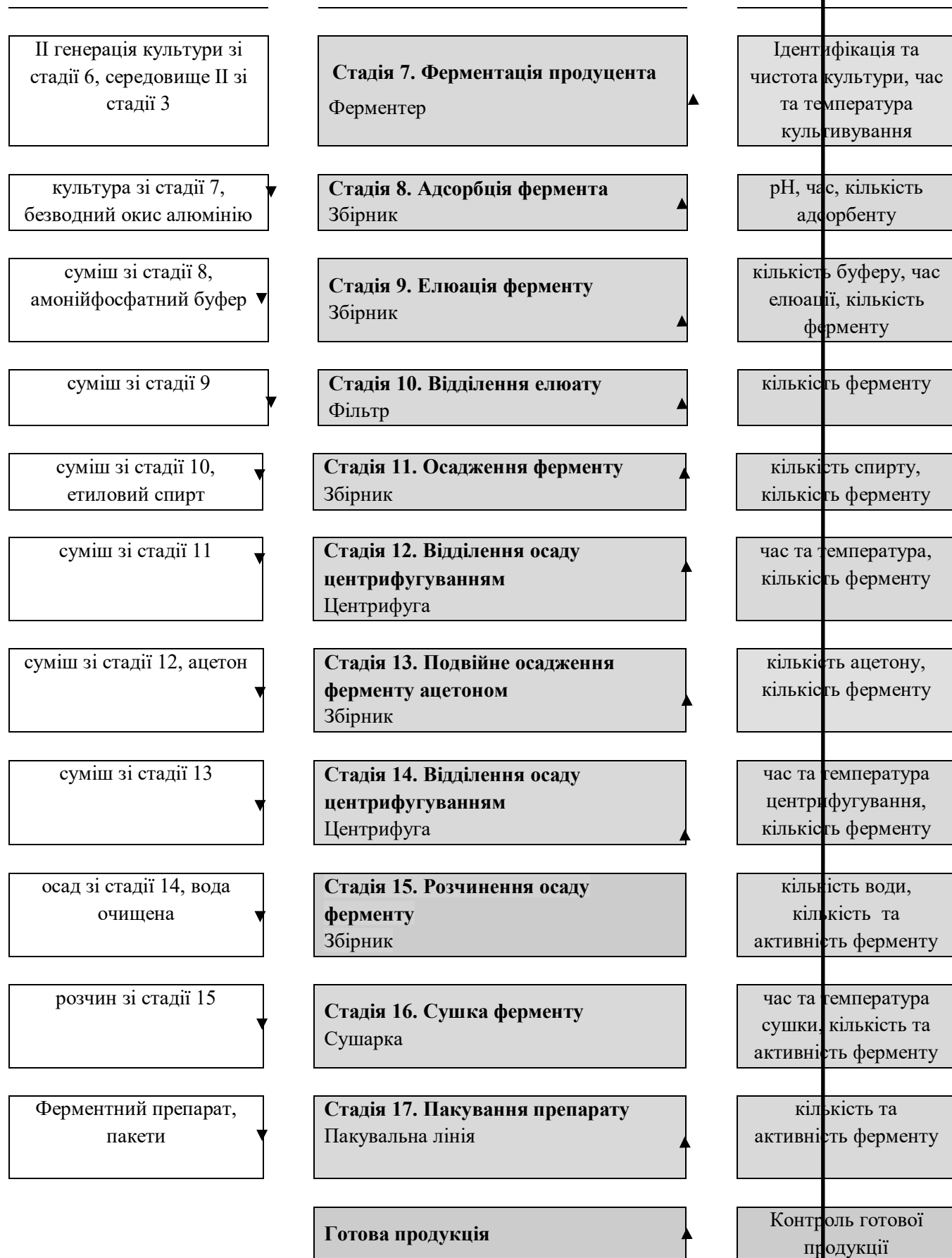


Рис. 5.2 - Технологічна схема виробництва ферменту глюкооксидази

80 % маси проса) і знову стерилізують. Відразу після останньої стерилізації пробірки з просом струшують та охолоджують.

Стадія 2. Приготування живильного середовища I

Середовище I використовують для отримання вегетативного посівного матеріалу I та II генерації. Склад середовища I:

цукор (глюкоза) - 2 г/л, KNO_3 - 0,6 г/л, кукурудзяний екстракт - 0,6 г/л (по сухій масі); pH 4,0- 4,2.

Середовище варять, автоклавують та розливають у колби Ерленмейєра для отримання I генерації та у інкулятор - для II генерації.

Стадія 3. Приготування живильного середовища II

Живильне середовище II використовують для основної стадії - ферментації продуцента.

Середовище II:

цукор (глюкоза) – 8 г/л, KNO_3 - 0,8 г/л, KH_2PO_4 – 0,01 г/л, KCl – 0,05г/л, MgSO_4 – 0,05 г/л, FeSO_4 – 0.001 г/л; pH 6,2 – 6,6.

Середовище готують у реакторі, після охолодження подають до ферментера.

Стадія 4. Підготовка посівного матеріалу

Посівний матеріал гриба готують двома способами: вирощування продуцента на просі і на пшениці. Спочатку конідії висівають на сусло-агар, розлитий в пробірки чи матраци і інкубують при температурі 25 °C протягом 30-40 днів. Після перевірки на чистоту посіву (макроскопічно та мікроскопічно) отриману культуру вносять на стерилізоване пшоно або просо.

*Підготовка посівного матеріалу *P. vitale* на просі*

В пробірки 20x2 см вносять 8-10 г чистого сухого проса, закривають їх ватними пробками і стерилізують їх в автоклаві при тиску в 2 атм (134 °C) протягом 20 хв. Сухе просо стерилізують двічі з інтервалом в 20-24 год. Після другої стерилізації в пробірки додають стерильну водопровідну воду (60 % - 80 % маси проса) і знову стерилізують. Відразу після останньої стерилізації

					162.01.15.00 000 ПЗ	4..
						7
2..	4..	№ докум.	Підпис	П.		

пробірки з просом струшують, охолоджують і засівають наважкою конідій в середовище Білай. В кожену пробірку вносять по 1 мл наважки конідій при концентрації їх в середовищі 2×10^6 в 1 мл. Посів конідій можна проводити шляхом зскрібання їх з агаризованої культури.

Гриб вирощують при температурі 24-25 °C протягом 1 місяця. Отриманий посівний матеріал надалі зберігають при кімнатній температурі в сухому місці до посіву. Термін придатності культури 1 рік.

Підготовка посівного матеріалу P. vitale на пшоні

Для отримання посівного матеріалу використовують пшоно вищого або першого сорту (попередньо визначають його вологість). Цільні зерна пшона поміщують в киплячу водопровідну воду (відношення води і пшона 1:1 на суху масу) і варять при перемішуванні протягом 15-20 хв. Напіврозвалене зерно залишають на 15-20 хв в теплій упаковці, а потім переносять на пергаментний папір для застигання і на фільтрувальний папір для підсушування. В спеціальні флакони об'ємом 250 мл переносять по 10-15 г із розрахунку на суху масу пшона. Флакони закривають ватними пробками, марлевими і пергаментними ковпачками і стерилізують текучою парою (температура 100 °C) протягом 30 хв, потім температуру підвищують і стерилізують при тиску 1 атм ще 30 хв. Після стерилізації пшоно охолоджують, струшують і повторно стерилізують в тому ж режимі через 20 год.

Для засіву готового середовища можна використовувати наважку конідій 1-2-місячної культури, вирощеної на су слово-агарі, або суспензію конідій стандартного посівного матеріалу, для чого в матрац чи флакон додають стерильну водопровідну воду з розрахунку, щоб отримана суспензія містила $(2-3) \times 10^5$ конідій в 1 мл. Для засіву середовища беруть 0,5-1 мл суспензії на флакон.

Після засіву конідій флакон закривають ватною пробкою, струшують для рівномірного розподілення культури в поживному субстраті і поміщають в термостат на 7-10 діб (24-25° C) до отримання хорошого рівномірного росту

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
2..	Ан	Ан	Підпис	Пн		7

і спороношення. Під час росту культуру періодично струшують.

Культуру, що виросла, піддають неперервному вакуумному сушінню при температурі не вище 28 °С протягом 48-72 год до досягнення постійної маси. Зменшення вологовмісту визначають щодоби зважуванням. Після висушування горло флакона з посівним матеріалом парафінують і покривають пергаментним ковпачком. До кожного флакону додається етикетка, на якій вказується назва штаму, номер паспорту і партії, дата випуску, термін придатності. Приготований таким чином посівний матеріал зберігають при кімнатній температурі і нормальній вологості. Термін придатності посівного матеріалу – 1 рік з моменту посіву конідій на субстрат.

Посівний матеріал *Penicillium vitale* Pidoplichko et Bilai apud Bilai має вигляд крупинок зеленого кольору, що вільно переміщаються при струшуванні флакона. У флаконі міститься близько 10-15 млрд. конідій. Проростання конідій повинно бути не менше 80%. Його визначають шляхом вирощування гриба в колбах об'ємом 0,75 л, що містять 120 мл середовища Білай, після 12-15 год ферментації на качалках при 240 об/хв., підраховуючи в рахувальній камері кількість клітин і виражають в процентах.

В посівному матеріалі стороння мікрофлора повинна бути відсутня. Чистоту посівного матеріалу перевіряють засівом на бульйон і агар Хоттінгера чи МПА і МПБ з 0,5% глюкози і інкубацією при температурі 37 °С до 4 діб. Для виключення забруднення дріжджами чи іншими грибами його висівають на сушений агар або середовище Чапека і інкубують при температурі 25 і 37 °С не менше 5 діб.

Морфологія, характерна для даного штаму: колонії на агарі Чапека з сахарозою спочатку білі, потім зелено-голубі, бархатні, покриті жовтими дрібними краплями, складчасті, з досить широким білим краєм, що надалі набувають брудно-сірого відтінку. Зворотна сторона колонії спочатку солом'яно-жовта, потім жовто-коричнева. Агар забарвлюється в зеленуватий

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
						7
2..	Ан	№ документа	Підпис	П..		

колір.

Активність посівного матеріалу визначають контрольною ферментацією по регламенту. Для цього 2% флаконів із партії посівного матеріалу піддають ферментації (після 43-46 год ферментації в колбах ємністю 0,75 л, що містять 200 мл середовища, рН інокулята складає 6,8-7,5. При засіві культурою ферментаційного середовища Білай із розрахунку 4-6 % після 72 год ферментації при інших оптимальних умовах культивування, рН культуральної рідини складає не менше 3,4-3,6, глюкооксидазна активність 40-50 од/мл і вище, каталазна активність 4-12 од/мл.

Розроблена схема ведення культури *P. vitale* - продуцента глюкооксидази і каталази дозволяє тривалий час зберігати рівень ферментативної активності.

Стадія 5. Вирощування вегетативного посівного матеріалу I генерації

Цей метод передбачає використання ферментерів різних конструкцій і об'ємів, з перемішуючими приладами (мішалками) різних типів, різноманітними способами подачі повітря і наявністю регулюючих приладів, що дозволяють слідкувати за ходом ферментаційного процесу.

Вирощування вегетативного посівного матеріалу I генерації проводять в колбах Ерленмейєра.

Середовище для отримання інокулята культури *P. vitale* (I генерація) - середовище I:

цукор - 2 г/л, KNO_3 - 0,6 г/л, кукурудзяний екстракт - 0,6 г/л (по сухій масі); рН 4,0- 4,2.

Колби Ерленмейєра ємністю 750 мл, що містять 200 мл середовища, засівають наважкою спор гриба із розрахунку $(0,6-1,2) \times 10^6$ конідій на 1 мл поживного середовища. Для посіву використовують 4-8-місячну культуру. Колби поміщують на качалку (240-260 об/хв.); температура культивування 26-28 °С, тривалість - 36-44 год. Рівень рН зростає до 6,8-7,5.

Першу генерацію вегетативної культури (5-10 % об'єму середовища) переносять в інокулятор і весь процес ферментації в залежності від режиму культивування закінчується протягом 72-120 год.

Стадія 6. Вирощування вегетативного посівного матеріалу II генерації

Першу генерацію вегетативної культури переносять із колб Ерленмейєра у інокулятор для отримання другої вегетативної генерації. Після певного періоду вирощування (по досягнення необхідної степені росту) вегетативну культуру переносять в інокулятор із середовищем I, звідки культура, що виросла надходить в ферментер.

В промислових умовах інокулятори містять декілька десятків літрів поживного середовища, посівні апарати - від декількох сотень до декількох тисяч літрів поживного середовища, ферментери - до десятки тисяч літрів ферментаційного середовища.

Стадія 7. Ферментація продуцента

Середовище для ведення процесу ферментації:

Середовище II: цукор – 8г/л, KNO_3 - 0,8 г/л, KH_2PO_4 – 0,01 г/л, KCl – 0,05г/л, $MgSO_4$ – 0.05 г/л, $FeSO_4$ – 0.001 г/л; pH 6,2 – 6,6.

Стерильне ферментаційне середовище засівають вегетативним посівним матеріалом (4-8 % об'єму середовища). Ферментація відбувається при 26-30 °С, тиск 0,2-0,3 атм, неперервне перемішування середовища мішалкою з швидкістю 270-280 об/хв протягом 72-96 год. Середовище аерують диференційованою подачею повітря в ферментер по схемі, приведений в табл. 4.1.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зна	Ан	№ документа	Підпис	Пос		7

Таблиця 5.1 - Режим аерації в динаміці ферментації *P. vitale*

Тривалість ферментації, год	Відношення об'єму повітря до середовища (за 1 хв)
1 – 6	1,5:1
6 – 12	2,2:1
18 – 24	2,0:1
24 – 36	1,7:1
36 – 48	2,0:1
48 – 64	2,2:1
64 – до закінчення процесу	2,5:1

Склад отриманої культуральної рідини: 80-100 од/мл глюкооксидази; 80-200 од/мл каталази; 1,5-2,2 г/100 мл середовища цукрів (фруктоза); 1,5-2,2 г/100 мл середовища глюконової кислоти; рН 3,8-4,1.

При промисловому отриманні глюкооксидази наважку спор гриба вносять у ферментер, що вміщує до 200 л поживного середовища (коефіцієнт заповнення 0,6). Щільність посіву $(0,6-1,2) \times 10^6$ конідій на 1 мл поживного середовища. Температура вирощування 26-28 °С, тиск 0,2-0,3 атм. Аерацію здійснюють із розрахунку 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища в хвилину при неперервному перемішуванні середовища мішалкою зі швидкістю 270-280 об/хв протягом 36-44 год. Для отримання великої кількості посівного матеріалу культуру, вирощену в інокуляторі, переносять в посівний апарат об'ємом 1-5 м³ на середовище аналогічного складу. Після культивування протягом 20-24 год при 26-28 °С, тиску 0,2-0,3 атм і аерації середовища з розрахунку 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища в хвилину посівний матеріал переносять в ферментер [2].

Піногасник - соняшникова олія: перша порція (0,05-0,1 % об'єму середовища) задається одночасно з посівним матеріалом, наступні порції (0,05 %) вводять по мірі утворення піни в середовищі. При цьому використовують ферментер з співвідношенням діаметра і висоти 1:2,3, двох'ярусну восьмилопатеку мішалку (280 об/хв) з чотирма відбійниками, встановленими на 2/3 висоти апарату [3].

Виділення та очищення ферменту відбувається протягом: стадія 8. Адсорбція ферменту, стадія 9. Елюація ферменту, стадія 10. Відділення

					162.01.15.00 000 ПЗ	4...
2...	4...	№ докум.	Підпис	П...		7

елюату, стадія 11. Осадження ферменту, стадія 12. Відділення осаду при центрифугуванні, стадія 13. Подвійне осадження ферменту із розчину ацетоном, стадія 14. Відділення осаду центрифугуванням, стадія 15. Розчинення осаду ферменту у воді, стадія 16. Сушка ферменту, після чого фермент передається на пакування та маркування.

З водних розчинів глюкозооксидаза виділяють за допомогою сірчанокислого амонію при додаванні його до кінцевої концентрації у розчині 52-55% насичення. Для цього до 2,5-3,0% водного розчину глюкозооксидази повільно додають при перемішуванні тонко розтертий порошок сірчанокислого амонію до вказаного насичення. При досягненні такого насичення утворюється невелика стійка каламуть. Кристалізація відбувається легше за кімнатної температури ніж при охолодженні і відбувається через 3-5 год після насичення сульфатом амонію.

З метою перекристалізації через 2-3 дні кристали відділяють від маточного розчину центрифугуванням (10 хв., 7000-8000 об/хв), розчиняють в дистильованій воді. Розчин центрифугують і фільтрують для виділення нерозчинних фракції та знову додають сульфат амонію до появи стійкої каламуті.

Друга кристалізація відбувається через 10 хв. Після доведення насичення розчину білка сульфатом амонію до вказаної концентрації. Третя перекисталізація здійснюється як друга.

Препарати глюкозооксидази дуже специфічні, оптимальне рН – 5,6, досить стійкі, температура дії 55°C.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
2..	Ан	№ докум.	Підпис	П...		7

6 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ВИРОБНИЦТВА

На кожній стадії технологічного процесу виробництва ферменту глюкооксидази, на якій працюють з біологічними агентами, контролюють параметри живильних середовищ та чистоту, ідентифікацію культур та кількість клітин (титр маткових та робочих культур, біомасу). Кількість клітин контролюють в камері Горяєва. Чистоту та ідентифікацію культур проводять шляхом приготування препаратів та мікроскопування.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки

Міцелій добре розвинутий, септований. Колонії ростуть повільно, спочатку білі, потім зелено-голубі, бархатні, дрібно пухнасті, вкриті жовтуватими дрібними каплями, зі складками, досить широким білим краєм, з часом набувають брудно-сірого кольору. Зі зворотної сторони колонії спочатку солом'яно-жовті, потім жовто-коричневі. Діаметр колоній 17 - 20 мм за 7 діб. Пігмент в середовище не виділяється.

Конідієносці 250-300 x 2-3,5 мкм, з одномутовчастою чи двоярусною кісточкою. Вітки більшої частини 10-15 x 2-3 мкм, фіаліди бутильчасті 6-8 x 2-3,5 мкм. Конідії еліптичні, часто яйцевидні, з віком можуть бути майже кулеподібними, 2,5-3 x 2-2,5 мкм [2, 4].

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
Зм	Ан	№ докум	Підпис	Підп		7

Таблиця 6.1 - Основні фактори середовища, що визначають зростання та біосинтетичну активність продуцентів

Фактор	Роль при культивуванні	Методи управління фактором
Склад та концентрація поживних речовин	Забезпечує метаболізм	Упорядкування оптимальної композиції; підживлення під час ферментації; безперервність процесу; багатостадійність з урахуванням потреб продуцента за фазами розвитку та ін.
Концентрація продуктів і інгібіторів	Уповільнює біохімічні реакції	Осадження продукту в міру накопичення; ферментація із діалізом; ферментація під розрідженням з випаровуванням летючого продукту та ін.
pH	Оптимізує швидкість біохімічних реакцій	Регулювання шляхом додавання кислоти чи лугу
Температура	Те саме	Охолодження або підігрів культуральної рідини за допомогою теплообмінників або температури субстратів, що подаються в біореактор.
Осмотичний тиск або активність води	Те саме	Упорядкування середовищ з оптимальною концентрацією поживних речовин або вологістю твердого середовища; підтримка на постійному рівні під час ферментації шляхом розведення водою або додаванням окремих компонентів
Вміст розчиненого кисню	Визначає межі життя (становить 0,6-0,998) Для аеробів забезпечує аеробний метаболізм; є акцептором H ⁺ ; інгибує розвиток	Для аеробних процесів регулюють інтенсивністю аерації або додаванням до газової суміші кисню. Анаеробні процеси реалізують у безкисневому середовищі

Вміст діоксиду вуглецю	Джерело вуглецю для автотрофів; деякі гетеротрофи потребують, а деякі уповільнюють метаболізм у присутності CO ₂	Продування у фотосинтезуючих процесах ферментації газовим середовищем, збагаченим CO ₂ ; виділенню CO ₂ із рідкої фази сприяє перемішування	
Перемішування середовища	Рівномірний розподіл поживних речовин та біомаси по всьому простору середовища	Організують макро- та мікроперемішування за допомогою механічних мішалок, барботажних, циркуляційних та інших систем.	
В'язкість середовища	Визначає дифузію поживних речовин та перемішування клітин продуцента	Регулює компоненти харчування, характер і концентрацію біомаси, наявність полімерних продуктів. впливає на перемішування та аерацію	

7 АВТОМАТИЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Засоби автоматизації наведено на апаратурній схемі, специфікація на які наведена в табл. 7.1.

Таблиця 7.1 - Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Позиція	назва параметру	місце установки	середа контролю	найменування приладу	тип приладу	кількість	завод виробник
1-1 4-1 7-1 8-1 10-1 11-1	температура	за місцем	сировина	термоперетворювач опору платиновий	ТСП-50М	6	ПБЗ «Луцьк»
1-3 4-3 7-3 8-3 8-4 10-3 10-4 11-3 11-4		за місцем		підсилювач потужності	У24	9	МЗТА Москва
1-4 4-4 7-4 8-5 10-5 11-5		за місцем		механізм електричний однооборотний	МЕО 25/0,63-63-94	6	МЗТА Москва
2-1 9-1 14-1 15-1 16-1	Тиск Вакуум	за місцем	повітря	тензометричний перетворювач тиску	сапфір-22ДИВ	5	АТ «СП Манометр» Харків
3-1 6-1	вага	за місцем	компоненти живильного середовища	ваги		2	
12-1 13-1	час	за місцем		реле часу	РВ-12	2	ПБЗ «Луцьк»
1-2 2-2 4-2 5-2 7-2 8-2 9-2 10-2 11-2 14-2 15-2 16-2				мікропроцесорний процесор типу Реміконт	Р-130	2	ПБЗ «Полава»

8 ЗАБЕСПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ВИРОБНИЦТВА НА ПІДПРИЄМСТВІ

«Компанія Ензим» - це компанія відкрита до інновацій, які активно впроваджуються на підприємстві шляхом аналізу зарубіжного досвіду та моніторингу ринку України. Це одна з перших українських компаній, яка впровадила систему управління безпечністю харчових продуктів відповідно до міжнародного стандарту ISO 22000 і успішно пройшла сертифікацію. Це амбітне, модернізоване, успішне європейське підприємство.

Автоматизація всіх процесів проводилася на основі конфігурації «Управління виробничим підприємством». Це потужна та багатофункціональна програма дозволила автоматизувати складні ділянки обліку за міжнародними стандартами, а також багатофункціональні механізми обліку та нарахування амортизації основних засобів. В результаті проведеної роботи створено автоматизовану систему яка забезпечує: створення єдиного інтегрованого рішення; актуальність інформації, можливість її оперативного використання; підвищення якості управлінської інформації; якісне та швидке забезпечення потреб діяльності компанії; поліпшення керованості компанії; підтримка планування виробництва на основі замовлень покупців; оптимізація виробництва відповідно заданих критеріїв (обсяг випуску для товарної ферментації, уникнути простоїв ферментів в результаті накладок при сепарації і т.д.); формування управлінських звітів для прийняття управлінських рішень; підтримка і автоматизація процедур компанії в частині ведення електронних версій журналів контролю якості показників і параметрів сировини для напівфабрикатів і готової продукції згідно вимог СУБХП і СУЯ з можливістю їх друку; забезпечення виконання принципу «Прослідковуваності» (по всьому ланцюгу від сировини і матеріалів до готової продукції) для сировини і матеріалів використаних на виробництво напівфабрикатів та партій готової

продукції згідно вимог HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) і системи управління безпекою харчових продуктів відповідно до міжнародного стандарту FSSC 22000.

Крім відповідності вимогам вимог HACCP і FSSC 22000 виробництво харчових ферментів на підприємстві сертифіковано відповідно Органік Стандарту (з врахуванням вимог Стандарту, що еквівалентний Постановам ЄС 834/2007 та 889/2008).

Органічне виробництво – це цілісна система господарювання та виробництва харчових продуктів, яка поєднує в собі найкращі практики з огляду на збереження довкілля, рівень біологічного розмаїття, збереження природних ресурсів, застосування високих стандартів належного утримання (добробуту) тварин та метод виробництва, який відповідає певним вимогам до продуктів, виготовлених з використанням речовин та процесів природного походження. Таким чином, метод органічного виробництва відіграє подвійну соціальну роль: з одного боку, забезпечує специфічний ринок, який відповідає потребам споживача у органічній продукції, а з іншого – забезпечує загальне благо, сприяючи захисту довкілля, належному утриманню тварин, а також розвитку сільської місцевості.

9. ПЛАН ЦЕХУ

План цеху виробництва ферментних препаратів на підприємстві «Ензим» наведений на рис. 9.1.

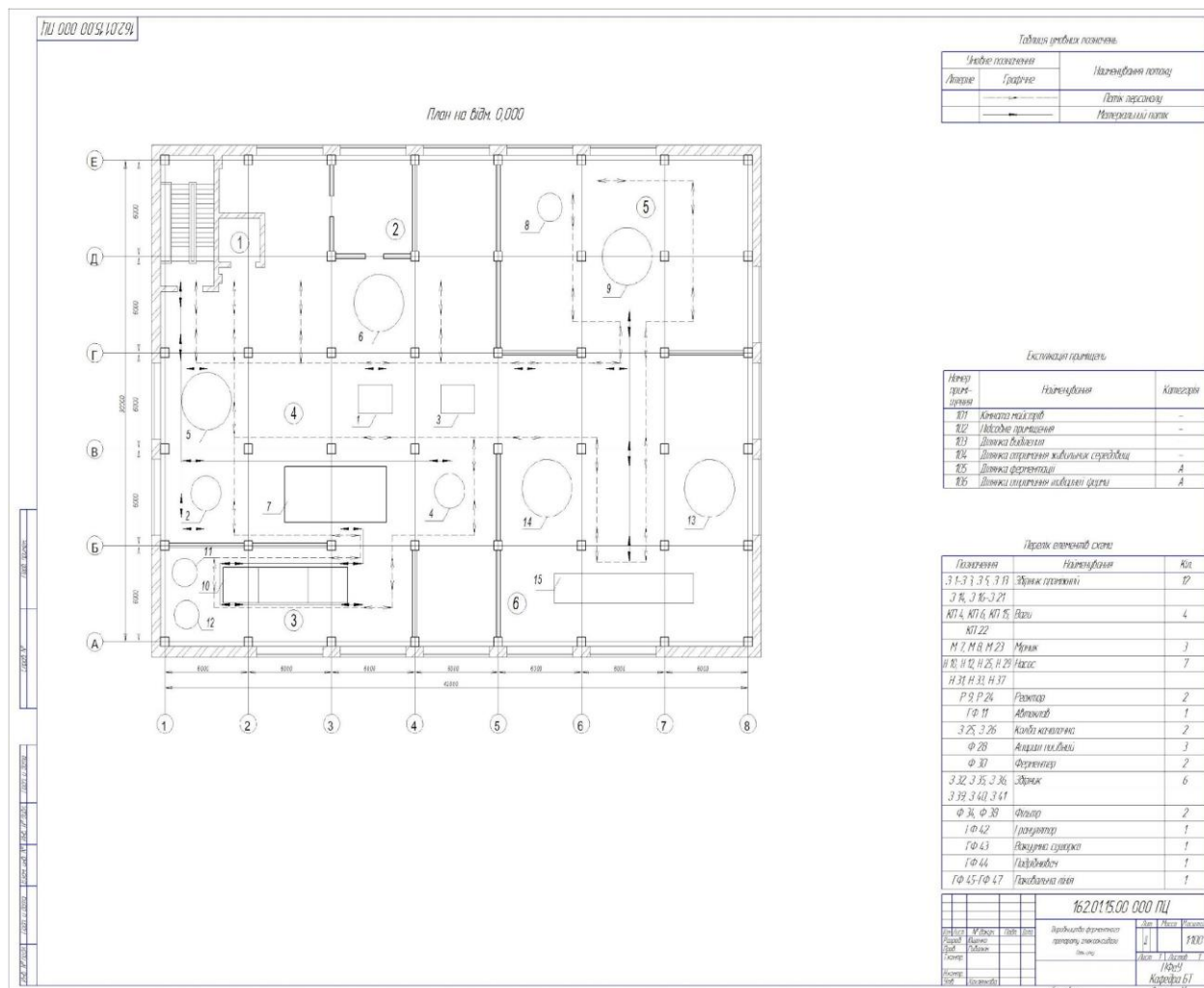


Рис. 9.1 - План цеху виробництва ферментних препаратів:

101 - кімната майстрів, 102 - підсобне приміщення, 103 - ділянка виділення та очищення ферментів, 104 - ділянка отримання живильних середовищ, 105 - ділянка ферментації, 106 - ділянка отримання товарної форми продукції

10. ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА

Цех з виробництва ферментних препаратів працює у дві зміни, тривалістю 8 години.

Об'єм серії - 1000 кг, кількість серій за рік - 100. Таким чином загальний річний об'єм виробництва харчового ферменту Глюкооксидаза за рік складає 100000 кг.

Розрахуємо баланс робочого часу обладнання (табл. 10.1).

Таблиця 10.1 - Баланс часу роботи обладнання

Фонд часу роботи обладнання	Мовні позначки	Показники	
		дні	години
Календарний	Φ_K	365	5840
Неробочий час:			
а) вихідні дні	$\Phi_{\text{вих}}$	104	1664
б) святкові дні	$\Phi_{\text{свят}}$	12	192
Номінальний	Φ_n	249	3984
Зупинки:			
а) на ремонт	$\Phi_{\text{рем}}$	30	480
б) з технологічних причин	$\Phi_{\text{тех}}$	-	-
Ефективний	Φ_e	219	3504

Виробнича потужність цеху за провідним обладнанням складає:

$$M = 1 \times 81,5 \times 3504 = 285714 \text{ пак. /рік.}$$

Оскільки у цеху виробляється ще 7 інших ферментних препаратів, розрахуємо питому вагу випуску харчового ферменту Глюкооксидаза в загальному обсязі продукції цеху:

$$\alpha = \frac{100000}{285714} \times 100 = 35 \%$$

За даними розрахунку, потужність цеху достатня для запланованого обсягу виробництва харчового ферменту.

Вартість будівель та споруд приймається на рівні первинної вартості.

Вартість обладнання розраховується на основі специфікації, складеної при його виборі, та діючих оптових цін (табл. 10.2).

					162.01.15.00 000 ПЗ	4...
2...	4...	Мб додати	Підпис	П...		8

Таблиця 10.2 - Специфікація та вартість обладнання

Найменування обладнання	Кількість одиниць обладнання, шт	Вартість одиниці обладнання, грн	Загальна вартість обладнання, грн
Реактор	4	260 000	1040000
Автоклав горизонтальний	2	110 000	220000
Збірник проміжний, 50 кг	10	40 000	400000
Сублімаційна сушарка	2	300 000	600000
Сублімаційна сушарка ТЕН 24	1	650 000	650000
Інокулятор 10 л	1	20 000	20000
Інокулятор 50 л	1	50 000	50000
Ферментер, 1000 л	1	200 000	200000
Центрифуга промислова	3	110 000	330000
Насос	5	25 000	125000
Лінія для упаковки у пластикові банки	1	250 000	250000
Всього	31		3885000

При визначенні підсумкової вартості основного обладнання необхідно врахувати і вартість неврахованого обладнання, яке складає 20% від вартості основного обладнання. Результати розрахунку вартості обладнання і вартості будинків і споруд наведені в табл. 3.

Таблиця 10.3 - Підсумкова вартість основних засобів

№	Найменування статті	Вартість обладнання, грн	Пояснення
1	2	3	4
1	Вартість основного обладнання	3885000	Табл. 2
1.1	в т. ч. сушарка	650000	Табл.2
2	Невраховане обладнання	777000	20 % від стр. 1
2.1	в т. ч. Сублімаційна сушарка	130000	20 % від стр. 1.1
3	Всього	4662000	стр.1 + стр. 2
3.1.	в т. ч. сушарка	780000	стр.1.1+стр. 2.1
4	Будинки та споруди	9653700	
5	Всього	14315700	стр. 3 + стр. 4

Таким чином, вартість основних засобів після переоснащення цеху складає 14315700 грн., в т.ч. вартість нового обладнання - 780000 грн. Зміна вартості основних засобів після переоснащення наведена у табл. 10.4.

Таблиця 10.4 - Розрахунок зміни вартості основних засобів після переоснащення

№ п/п	Об'єкт	Вартість, грн		Приріст, грн
		за даними підприємства	за даними проекту	
1	Будівлі і споруди	9653700	9653700	0
2	Обладнання	3882000	4662000	+780000
4	Всього	13535700	14315700	+780000

Для розрахунку фонду оплати праці необхідно розрахувати баланс робочого часу робітника (табл. 10.5.)

Таблиця 10.5 - Баланс робочого часу робітника

Витрата часу	Умовні позначення	Показники	
		Дні	Години
1	2	3	4
Календарний фонд робочого часу	Φ_k	365	2920
Кількість вихідних днів	$\Phi_{\text{вих}}$	105	840
Кількість святкових днів	$\Phi_{\text{празд}}$	8	64
Кількість неробочих днів	$\Phi_{\text{н.р.}}$	113	904
Номінальний фонд робочого часу	Φ_n	252	2016
Невиходи, які плануються	$\Phi_{\text{нев}}$	35	280
Тарифні відпустки	$\Phi_{\text{отп}}$	24	192
Хвороби	$\Phi_{\text{бол}}$	7,5	60
Декретні відпустки	$\Phi_{\text{отп}}$	2	16
Інші невиходи із дозволу адміністрації	$\Phi_{\text{др}}$	1,5	12
Кількість робочих днів		216	1728
Кількість передсвяткових днів, в які тривалість робочого дня зменшується на одну годину		7	7
Ефективний фонд робочого часу	Φ_e	216	1721

Розрахунок фонду оплати праці робітників цеху.

Основна заробітна плата розраховується з урахуванням кількості робітників, ефективного фонду робочого часу одного робітника та його ставки

					162.01.15.00 000 ПЗ	4...
2...	4...	№ документа	Підпис	Пол		8

(табл. 10.6). Додаткова заробітна плата складає 60% фонду основної заробітної плати.

Таблиця 10.6 - Розрахунок чисельності і заробітної плати основних і допоміжних робітників

Професія	Кількість робітників	Розрахунок тарифної ставки, грн.		Розрахунок фонду оплати праці, грн		
		за год.	за зміну	основна заробітна плата	додаткова заробітна плата	фонд оплати праці
1	2	3	4	5	6	7
1 Основні робітники:						
1.1. Оператори програмного обладнання	6	45,00	270	77445	46467	123912
1.2 Начальник цеху	1	53,00	53	91213	54727,8	145940,8
1.3 Зам начальника цеху	1	52,00	52	89492	53695,2	143187,2
1.4 Майстер цеху	1	51,00	51	87771	52662,6	140433,6
1.5 Зам майстера цеху	1	50,00	50	86050	51630	137680
Разом	10			431971	259182,6	691153,6
2 Допоміжні робітники:						
2.1 Прибиральниця	2	36,00	72	61956	37173,6	99129,6
2.2 Вантажник	2	36,00	72	61956	37173,6	99129,6
2.3 Доглядачі приладів	2	38,00	76	65398	39238,8	104636,8
Разом	6			189310	113586	302896
Всього робітників	16			621281	372768,6	994049,6

Собівартість харчового ферменту Глюкооксидаза розраховується з урахуванням положень П(с)БО 16 на основі попередніх розрахунків. Розрахунок собівартості наведено в табл. 10.7 та 10.8.

					162.01.15.00 000 ПЗ	4...
2...	4...	№ документа	Підпис	П...		8

Таблиця 10.7 - Розрахунок витрат на сировину та матеріали за серію (1 000 кг)

Найменування матеріалу	Од. вимір.	Норма витрат	Ціна за одиницю, грн	Сума, грн
Сировина та основні матеріали				
- кукурудзяний екстракт	кг	92	390,00	35880
- пептон	кг	18	550,00	9900
- хлористий натрій	кг	12	150,00	1800
- глюкоза	кг	65	170,00	11050
- нітрит амонію	кг	7	125,00	875
- вітаміни	кг	3	230,00	690
- мінеральні солі	кг	5	413,00	2065
- етиловий спирт	кг	12	190,00	2280
- вода питна	л	1000	1,5	1500
Всього				66040
Допоміжні матеріали				
- пакети Zip-Lock	шт	1005	60	70350
- етикетка	шт	1005	3	3015
- групові коробки	шт	102	20	2040
Всього				75405

Таблиця 10.8 - Проектна калькуляція собівартості харчового ферменту
Глюкооксидаза Калькуляційна одиниця – 1000 кг

№ п/п	Статті витрат	Сума, грн
1	Сировина та основні матеріали	66040
2	Допоміжні матеріали	75405
3	Транспортно-заготівельні витрати	3302
	Всього	144747
4	Заробітна плата	7566
4.1	Основна заробітна плата	5342
4.2	Додаткова заробітна плата	2224
5	Відрахування на соціальні заходи	1740,18
6	Загальновиробничі витрати	16026
7	Виробнича собівартість	170079,2
8	Адміністративні витрати	13889,2
9	Витрати на збут	2136,8
10	Інші операційні витрати	3739,4
11	Повна собівартість	189844,6
12	Договірна ціна	990000

					162.01.15.00 000 ПЗ	А...
2...	А...	Аб А...	Під...	П...		8

13	Рентабельність, %	421%
----	-------------------	------

Порівняльний аналіз собівартості продукції за даними підприємства та проектом наведений у табл. 10.9.

Таблиця 10.9 - Аналіз зміни собівартості продукції.

Статті витрат	За даними підприємства	За даними проекту	Зміна
1. Сировина і матеріали	68090	66040	-1050
2. Допоміжні матеріали	75828	75405	-423
3. Транспортно-заготівельні витрати	3362,25	3302	-60,25
4. Основна і додаткова заробітна плата	7998,9	7566	-432,9
5. Відрахування на заробітну плату	1904,37	1740,18	-164,19
6. Загальновиробничі витрати	16279,69	16026	-253,69
7. Виробнича собівартість	173463,2	170079,2	-3384,03
8. Адміністративні витрати	14312,2	13889,2	-423
9. Витрати на збут	2239,3	2136,8	-102,5
10 Інші	4172,3	3739,4	-432,9
10. Повна собівартість	194187	189844,6	-4342,4

З наведених даних видно, що у результаті переоснащення виробництва виробнича собівартість харчового ферменту Глюкооксидаза знизиться на 3384,03 грн., повна собівартість – на 4342,4 грн.

Прибуток після реалізації заходу (переоснащення цеху) складе:

$$(800155,4-795813) \times 100 = 434240 \text{ грн.}$$

Продуктивність праці дорівнює:

$$B_{\text{п}} = 990000 \times 100 / 16 = 6187500 \text{ грн./чол.}$$

$$B_{\text{с}} = 990000 \times 100 / 16 = 6187500 \text{ грн./чол.}$$

Строк окупності дорівнює:

$$T = (780000 \times 0,35) / 434240 = 0,63 \text{ року}$$

Чистий приведений дохід:

$$NPV = 434240 - 780000 \times 0,35 = 161240 \text{ грн.}$$

Основні техніко-економічних показники проектного об'єкту наведені в табл. 10.10.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
2..	Ан	Мб доходу	Підви	Пс		9

Техніко-економічні розрахунки переоснащення виробництва харчового ферменту Глюкооксидаза виробник компанія «Ензим», упаковка - Пакет Zip-Lock: 1 кг свідчать, що:

- чистий приведений дохід становить 161240 грн.;
- впровадженні техніко-економічні заходи окупаються через 0,63 року;
- продуктивність праці є незмінною і складає 6187500 грн./чол.;

Таблиця 10.10 - Основні техніко-економічні показники проектного об'єкту

№ п/п	Показники	Од. вим.	Діюче виробництво	Проектоване виробництво
1	Річний випуск	тис. пак. тис. кг.	100 100000	100 100000
2	Капітальні витрати, пов'язані з впровадженням техніко-економічних заходів з урахуванням частки продукту	грн.		390000
6	Кількість працюючих:	чол.	16	16
7	- основні робітники	чол.	10	10
8	- допоміжні робітники	чол.	6	6
9	Продуктивність праці	грн/чол.	6187500	6187500
10	Повна собівартість препарату	грн/тис. кг	194187	189844,6
11	Ціна відпускна	грн/тис. кг.	990000	990000
12	Прибуток	грн/тис. кг.	795813	800155,4
13	Рентабельність препарату	%	409	421
14	Чистий приведений ефект	грн.		161240
15	Строк окупності проєктованих заходів	рік		0,63

- рентабельність продукції підвищиться на 12% .

Згідно цих даних та маркетингових досліджень виробництво харчового ферменту Глюкооксидаза виробник компанія «Ензим», упаковка - Пакет Zip-Lock: 1 кг є економічно вигідним.

ВИСНОВКИ

Виготовлення ферментних препаратів займає одне з передових місць в сучасній біотехнології. Об'єм продукції постійно росте, а сфера використання постійно розширюється. Такий швидкий розвиток пов'язаний з тим, що ферменти є високоактивними, нетоксичними біокаталізаторами білкового походження, які широко поширені в природі і без них неможливе здійснення багатьох біохімічних процесів і життя в цілому.

Серед ферментних препаратів привертає увагу фермент глюкооксидаза, яка широко використовується в харчовій промисловості для обробки сировини, в медицині як біосенсор визначення глюкози та як антисептичний засіб.

Біотехнологічним методом глюкооксидазу виробляють поверхневим та глибинним культивуванням продуценту гриба *Penicillium vitale* Pidoplitschko et Bilaj (*P. vitale*) з класу *Ascomycetes*, родини *Aspergillaceae*, роду *Penicillium*.

На підприємстві «Ензим» глюкооксидазу на основі *Penicillium vitale* виробляють також і каталазу, так як при культивуванні в залежності від співвідношення в середовищі кількості глюкози та нітрату калію утворюється або глюкозооксидаза, або каталаза. При високому вмісті глюкози і низькому нітрату калію в середовищі синтезується глюкозооксидаза. Але при будь-якому співвідношенні нітрату калію і глюкози синтезуються обидва ферменти.

У роботі розроблена біологічна, технологічна та апаратурна схеми, проведений вибір основного обладнання - сушарки, яка буде забезпечувати отримання ферменту високої якості, є енергетичноощадною та автоматизованою установкою, спроектована дільниця виробництва ферментних препаратів. Техніко-економічні розрахунки підтвердили раціональність запропонованих заходів.

					162.01.15.00 000 ПЗ	Ан
						9
Зн	Ан	Мб доцент	Підпис	Па		

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. К.: Фірма «ІНКОС». 2006. 647 с.
2. Біохімічний і біотехнологічний словник [Текст] / В.Л. Галяс, А.Г. Колотницький. Л. : Оріяна-Нова, 2006. 468 с.
3. Дніпровська асоціація-К (DAK-Biotech): продукція - <https://star-k.com.ua/> (дата звертання: 01.10.2022)
4. Ензим - напрямки: харчові ферменти - <https://enzim.ua/index.php?page=main&lng=uk#harchoprom> (дата звертання: 01.10.2022)
5. Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України - <https://imv.org.ua/> (дата звертання: 01.10.2022)
6. Клітинна та генна інженерія : підручник / О.В. Карпов, С.В. Демидов, С.С. Кириченко. К. : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.
7. Національна Академія Наук України. Інститут Біології Клітини: напрями - <https://www.nas.gov.ua/UA/Org/ScientificDirections/Pages> (дата звертання 05.10.2022)
8. Пирог Т. П. Біохімічні основи мікробного синтезу (курс лекцій). К.: НУХТ. 2006. 162 с.
9. Пирог Т. П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія : підручник. К. : НУХТ, 2009. 336 с.
10. Сучасні методи біохімічних досліджень / М. Е. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войціцький. К. : Фітосоціоцентр, 2001. 424 с.
11. Технології мікробного синтезу лікарських засобів. Навчальний посібник / Л.М. Буценко, Ю.М.Пенчук, Т.П. Пирог. К. : НУХТ. 2009. 177 с.
12. Adrio J. L., Demain A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological

					162.01.15.00 000 ПЗ	4
Зм.	Лн	№ докум.	Підпис	Пд		9

processes. Biomolecules 4, 2014. 117–139. doi: 10.3390/biom 4010117

13. Anas A., Arbain N. G. D. Effects of selected medium components for production of glucose oxidase by a local isolate *Aspergillus terreus* UniMAP AA-1. APCBEE Proc. 2, 2020. 125–128. doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.023.

14. Development of silicalite/glucose oxidase based biosensor and its application for glucose determination in juices and nectars / O. Y. Dudchenko, V. M. Pyeshkova, O. O. Soldatkin, B. Akata, B. O. Kasap, A. P. Soldatkin, et al. Nanoscale Res. Lett. 2016. 11:59. doi: 10.1186/s11671-016-1275-2.

15. Enzymatic bioactivity investigation of glucose oxidase modified with hydrophilic or hydrophobic polymers via in situ RAFT polymerization / Xu G., Xu Y., Li A., Chen T., Liu J. J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 55, 2017. 1289–1293. doi: 10.1002/pola.28503.

16. Genetic and phenotypic diversity of naturally isolated wild strains of *Aspergillus niger* with hyper glucose oxidase production / M. El-Hariri, H. A. Al-Yazeed, A. Samir, R. Elhelw, R. J. Soliman. Biosci. Biotechnol. 2015. 4. 245–253.

17. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated grapheme-carbon nanotubes / R. Devasenathipathy, V. Mani, S. M. Chen, S. T. Huang, T. T. Huang, C. M. Lin, et al. Enzym. Microb. Technol. 2015. 78. 40–45. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.006.

18. Gunasundari S. Production of glucose oxidase from *Aspergillus oryzae* by liquid state fermentation for the preservation of food. Int. J. Ethnomed. Pharmacol. 2020. Res. 2, 51–57.

19. Improvement in ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium* cultures by glucose oxidase/ Ansari Z., Karimi A., Ebrahimi S., Emami, E. Biochem. Eng. J. 105, 2016. 332–338. doi: 10.1016/j.bej.2015.10.007.

20. Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates / M K. Dubey, A. Zehra, M. Aamir, M. Meena, L. Ahirwal, S. Singh, S. Shukla, R. S. Upadhyay, R. Bueno-Mari, V. K. Bajpai. Frontiers in Microbiology. 2017. doi:

					162.01.15.00 000 ПЗ	4..
2..	Ан	№ докум	Подан	Пр		9

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01032>.

21. Identification and structural analysis of amino acid substitutions that increase the stability and activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase / Marín-Navarro, J., Roupain N., Talens-Perales D., Polaina J. 2015. PLoS ONE 10:e0144289. doi: 10.1371/journal.pone.0144289.

22. Monitoring of glucose in beer brewing by a carbon nanotubes based nylon nanofibrous biosensor / Mason M., Longo E., Scampicchio M. J. 2016. Nanomat. 11:e5217023. doi: 10.1155/2016/5217023.

23. The bread dough stability improving effect of pyranose oxidase from *Trametes multicolour* and glucose oxidase from *Aspergillus niger*: unraveling the molecular mechanism / Decamps K., Joye I. J., Rakotozafy L., Nicolas J., Courtin C. M., Delcour J. A. J. Agric. Food Chem. 2016. 61. 7848–7854. doi: 10.1021/jf4021416.

					162.01.15.00 000 IT3	Αν
						9
2α	Αν	Με Δοκιμ	Πιδαν	Πα		

ДОДАТКИ

The drawing consists of two views of a mechanical component. The top view is a cross-section labeled $A-A$, showing a circular part with a central cross-shaped structure and four radial arms, labeled 7 and 9. The bottom view is a longitudinal section showing a cylindrical body with internal components, labeled 1 through 8. It includes force vectors A , B , and I , and a rotation arrow at the bottom.

№ док.	Познач.	Найменування	$\frac{1}{100}$	Примітка
1	Асфальт		1	
2	Пилова сировина		1	
3	Лес. заготовлений		1	
4	Асфальт		1	
5	Вода		1	
6	Грунти		1	
7	Груди металу		1	
8	Лес. для обшивання		1	
9	Опаки		1	
10	Вологий метал		1	
11	Висушений метал		1	
12	Лес. металу		1	
13	Лес. дошки		1	
14	Кордони будови пали		1	

[illegible]

160 N 103th	110th & 103rd	103rd Ave N 116th St	110th & 103rd	160 N 103th
-------------	---------------	----------------------	---------------	-------------



Трудности графических изображений

Наименование потока	Учебные программы	
	Английский	Французский
Поток персонажей		
Материалы потока		

ЕКЛІВІКЦІЇ ПРАВИЦЬ

Индикатор качества	Наименование	Категория
01	Численность персонала	—
02	Уровень квалификации персонала	—
03	Длительность обучения персонала	—
04	Длительность хранения сырья/материалов	A
05	Длительность хранения готовой продукции	A
06	Длительность хранения готовой продукции	A

Продукт элементів скарпу

[illegible][illegible]

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Автоматизація технологічного процесу	Олександр МАНСЬКИЙ, доцент закладу вищої освіти кафедри ТФП	24.10.2022	25.11.2022
Економічна частина	Ольга ГЛАДКОВА, доцент закладу вищої освіти кафедри УЗЯФ	24.10.2022	25.11.2022

7. Дата видачі завдання 14 вересня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

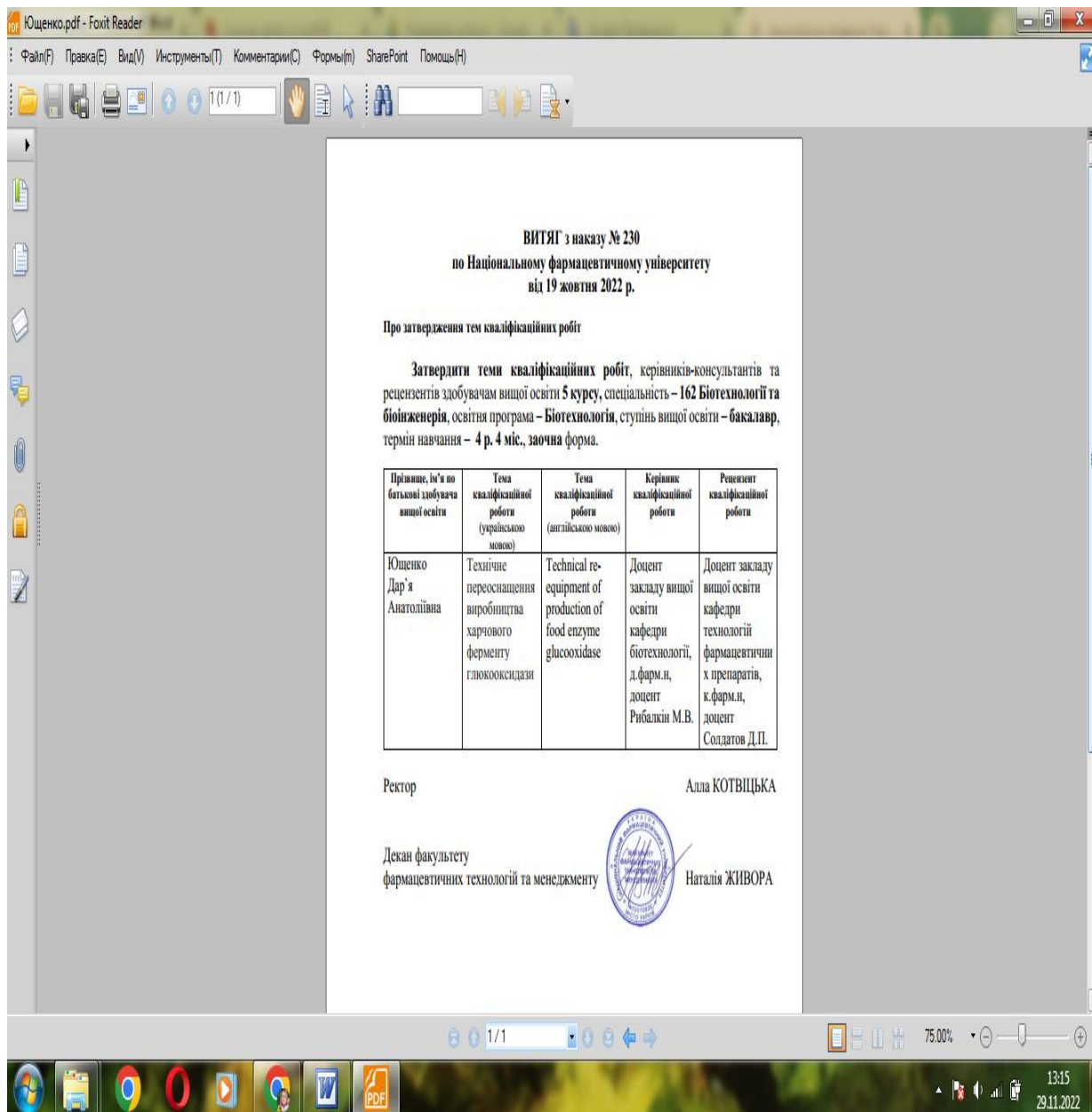
№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Робота з літературою	вересень 2022	Виконано
2	Оформлення розрахунково-пояснювальної записки	вересень 2022	Виконано
3	Оформлення графічної частини	листопад 2022	Виконано
4	Здача кваліфікаційної роботи	02 грудня 2022	Виконано

Здобувач вищої освіти

(підпис) Дар'я ЮЩЕНКО
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

Керівник кваліфікаційної роботи

(підпис) Микола РИБАЛКІН
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)



ВИТЯГ з наказу № 230
по Національному фармацевтичному університету
від 19 жовтня 2022 р.

Про затвердження тем кваліфікаційних робіт

Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти 5 курсу, спеціальність – 162 Біотехнології та біоінженерія, освітня програма – Біотехнологія, ступінь вищої освіти – бакалавр, термін навчання – 4 р. 4 міс., заочна форма.

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
Ющенко Дар'я Анатоліївна	Технічне переоснащення виробництва харчового ферменту глюкооксидазин	Technical re-equipment of production of food enzyme glucooxidase	Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології, д.фарм.н, доцент Рибалкін М.В.	Доцент закладу вищої освіти кафедри технологій фармацевтичних препаратів, к.фарм.н, доцент Соддатов Д.П.

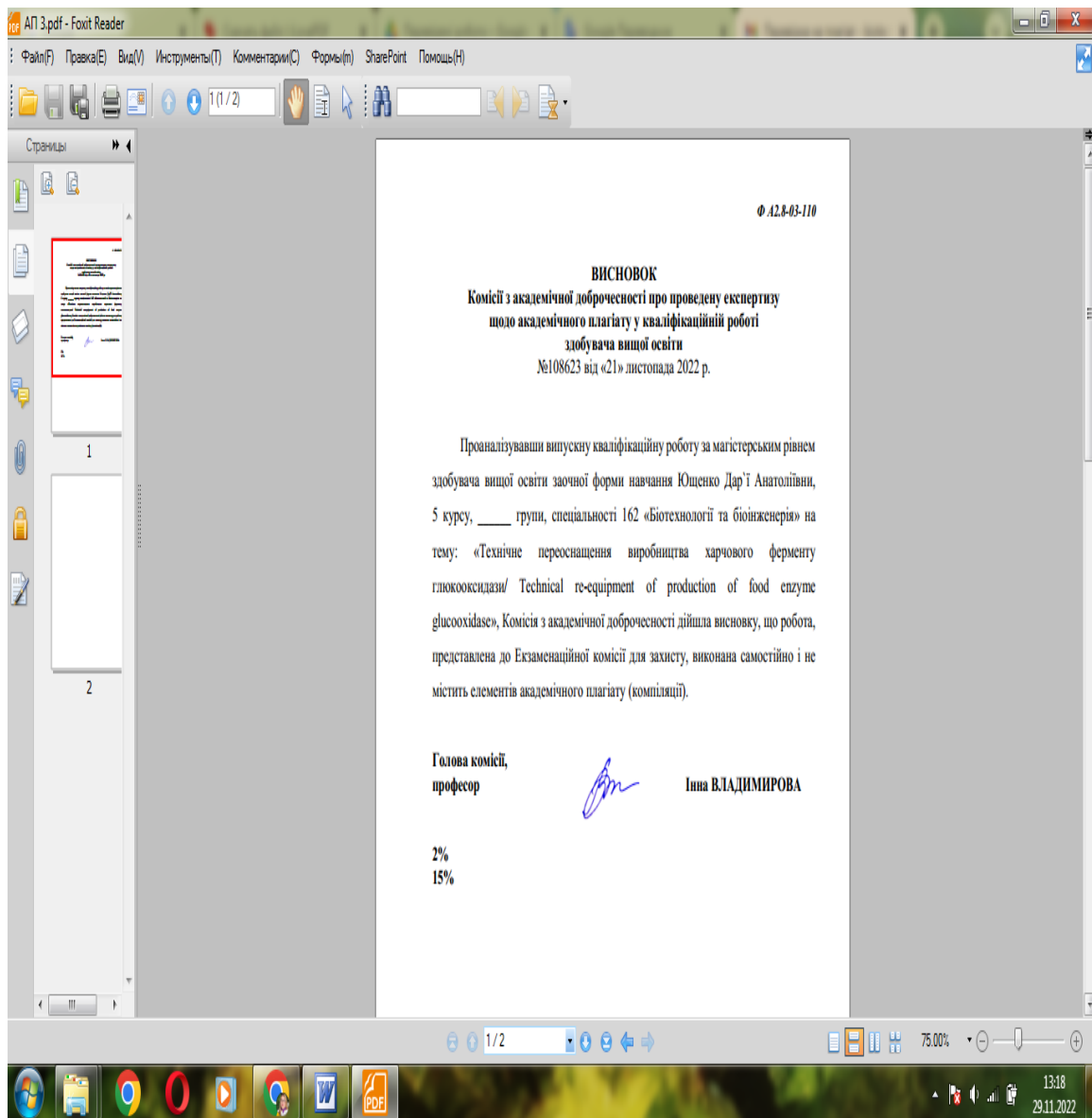
Ректор

Алла КОТВИЦЬКА

Декан факультету
фармацевтичних технологій та менеджменту



Наталія ЖИВОРА



ВІДГУК

керівника на кваліфікаційну роботу бакалаврського ступеня вищої освіти спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Дар'ї ЮЩЕНКО

на тему: Технічне переоснащення виробництва харчового ферменту глюкооксидази

Актуальність теми. Загальною тенденцією для України є те, що сучасні потреби промисловості у ферментних препаратах більш ніж на 80 % задовольняються за рахунок імпорту. На частку українських виробників припадає близько 20 %. При цьому впродовж останніх кількох років внутрішнє виробництво демонструє тенденцію до росту, що зумовлено попитом споживачів ферментів на вітчизняну продукцію. Одним із найуспішніших виробником цього продукту в Україні є компанія Ензим, яка є лідером серед препаратів та продуктів, виробництво яких засновано на технологіях мікробного синтезу. Тому тема роботи, присвячена технічному переоснащенню виробництва харчового ферменту, що виробляється вітчизняною компанією на основі технологій мікробного синтезу, є актуальною.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. У роботі проведене технічне переоснащення виробництва ферменту глюкооксидази, направлене на поліпшення якості кінцевого продукту та зменшення технологічного циклу процесу, за рахунок переоснащення стадії сушки продукту. Окрім автоматизації процесу ця заміна призведе до скорочення часу процесу, зменшенню витрат сировини та підвищенню витрат, що підтверджено техніко-економічними розрахунками.

Оцінка роботи. У роботі розглянуті всі необхідні розділи: маркетингові дослідження, аналітичний огляд, опис технологічного процесу; представлені технологічні розрахунки: матеріального балансу, основного та допоміжного обладнання, запропонованого обладнання; за всіма вимогами виконанні необхідні креслення: технологічної схеми, апаратурної схеми, плану цеху, загальний вигляд сушарки.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Робота містить всі необхідні розділи, виконана якісно, відповідно до інженерних та технологічних вимог до кваліфікаційних робіт бакалавра. Дана кваліфікаційна робота може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії, а її автор заслуговує присвоєння кваліфікації «бакалавр з біотехнологій та біоінженерії».

Керівник

_____ (підпис)

Микола РИБАЛКІН

_____ (Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

" 28 " листопада 2022 р.

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу _____ Дар'ї ЮЩЕНКО _____

на тему: Технічне переоснащення виробництва харчового ферменту глюкооксидази

Актуальність теми. Виготовлення ферментних препаратів займає одне з передових місць в сучасній біотехнології. Об'єм продукції постійно росте, а сфера використання постійно розширюється. Такий швидкий розвиток пов'язаний з тим, що ферменти є високоактивними, нетоксичними біокаталізаторами білкового походження, які широко поширені в природі і без них неможливе здійснення багатьох біохімічних процесів і життя в цілому. Серед ферментних препаратів важливим є глюкооксидаза, яка широко використовується в харчовій промисловості для обробки сировини. Тому тема роботи, а саме технічне переоснащення виробництва харчового ферменту глюкооксидази, є актуальною.

Теоретичний рівень роботи У роботі на достатньо високому теоретичному рівні розглянуто потреби промисловості, зокрема харчової, у якісних та ефективних ферментних препаратах, вивчено виробництво глюкооксидази на основі технологій мікробного синтезу, проаналізовано продуценти, що використовуються для виробництва ферментів розглянуто обладнання, сировину та допоміжні матеріали, нормативну базу згідно якої сьогодні відбувається виробництво даної групи продуктів в нашій країні.

Пропозиції автора по темі дослідження У кваліфікаційній роботі наведено характеристику ферменту глюкооксидази, сировини, що використовується у виробництві, продуцента, представлено технологічну та апаратурну схеми із описом технологічного процесу, розраховано технологічне обладнання. У роботі запропоновано замінити сушарку на стадії отримання товарної форми продукції. Дана заміна дозволить проводити процес сушки швидше, із меншими витратами сировини.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість Пропозиції автора щодо технічного переоснащення стадії сушки ферменту можуть бути використанні на виробництві для покращення параметрів виробництва, зниження витрат, поліпшення якості продукції, збільшення обсягів виробництва.

Недоліки роботи Необхідно звернути увагу на посилання на джерела літератури у роботі.

Загальний висновок і оцінка роботи Робота містить всі необхідні розділи, розрахунки та креслення, виконана відповідно до вимог та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії.

Рецензент _____
(підпис)

доцент Дмитро СОЛДАТОВ _____
(вчене звання, Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

«29» листопада 2022 р.

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 5

«30» листопада 2022 року

м. Харків

Засідання кафедри біотехнології

Голова: завідувачка кафедри, доктор фармацевтичних наук, професор Наталя ХОХЛЕНКОВА.

Секретар: доцент закладу вищої освіти Юлія АЗАРЕНКО.

ПРИСУТНІ: завідувачка кафедри Наталя ХОХЛЕНКОВА, професор закладу вищої освіти Леонід СТРЕЛЬНИКОВ, професор закладу вищої освіти Оксана СТРИЛЕЦЬ, доцент закладу вищої освіти Ольга КАЛЮЖНАЯ, доцент закладу вищої освіти Микола РИБАЛКІН, доцент закладу вищої освіти Юлія АЗАРЕНКО, доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Про представлення до захисту до Екзаменаційної комісії випускних кваліфікаційних робіт.

І. СЛУХАЛИ:

Здобувача вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія» ОП «Біотехнологія» заочної форми 5 курсу 1 групи Дар'ю ЮЩЕНКО з доповіддю на тему «Технічне переоснащення виробництва харчового ферменту глюкооксидази» (керівник доцент закладу вищої освіти Микола РИБАЛКІН).

УХВАЛИЛИ:

Рекомендувати до захисту кваліфікаційну роботу.

Голова

завідувачка кафедри,
доктор фармацевтичних наук,
професор

Наталя ХОХЛЕНКОВА

(підпис)

Секретар

доцент закладу вищої освіти

Юлія Азаренко

(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувач вищої освіти _____ Дар'я ЮЩЕНКО
(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ)

до захисту кваліфікаційної роботи
за галуззю знань 16 Хімічна та біоінженерія
спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітньою програмою Біотехнологія
на тему: «Технічне переоснащення виробництва харчового ферменту глюкооксидази»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ Наталія ЖИВОРА

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Дар'я ЮЩЕНКО рекомендується до захисту в Екзаменаційну комісію з кваліфікаційною роботою на тему: «Технічне переоснащення виробництва харчового ферменту глюкооксидази»

Керівник кваліфікаційної роботи _____ Микола РИБАЛКІН

“28” листопада 2022 року

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Дар'я ЮЩЕНКО допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри біотехнології _____ Наталя ХОХЛЕНКОВА

“30” листопада 2022 року

Кваліфікаційну роботу захищено
у Екзаменаційній комісії
« 07 » грудня 2022 р.

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,
доктор біологічних наук

_____ / Ігор ТРУТАЄВ /