

Міністерство освіти і науки України
Одеський національний технологічний університет
Навчально-науковий інститут харчових технологій ім. М.О. Грішина
Кафедра харчової хімії, експертизи та біотехнологій
Перший рівень вищої освіти «Бакалавр»
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Освітня програма «Біотехнології та біоінженерія»



КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА БАКАЛАВРА

на тему:

Удосконалення технології **ферментного препарату бета-глюканази**

Здобувача: Курпич В. К.
(прізвище та ініціали студента)

Керівник: к.т.н., доцент Кананихіна О.М.
(посада, прізвище та ініціали)

Консультант: проф. Самофатова В.А. (посада,
прізвище та ініціали)

Кваліфікаційна робота допускається до захисту

Рішення кафедри від 08.06. 2026 р., протокол № 10

Завідувачка кафедри ХХЕтаБ підписано Антоніна КАПУСТЯН

(підпис)

(Ім'я ПРІЗВИЩЕ)

Одеса – 2026 рік

Одеський національний технологічний університет

(повне найменування вищого навчального закладу)

Навчально-науковий інститут харчових технологій ім. М.О. Грішина
Кафедра харчової хімії, експертизи та біотехнологій
Перший рівень вищої освіти «Бакалавр»
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Освітня програма «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
зав. кафедри ХХЕтаБ

ПІДПИСАНО д.т.н., проф. Капустян А.І.
(підпис)

«30» січня 2026 р.

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА Курпич Валентин Костянтинович

1. Тема роботи: Удосконалення технології ферментного препарату бета-глюканази
затверджена наказом ОНТУ від 08.10.2025 р. наказ №543-03

2. Термін здачі здобувачем закінченої роботи 22.05.2026 р.

3. Вихідні дані роботи

Об'єкт дослідження: технологія отримання ферментного препарату бета-глюканази на основі *Trichoderma reesei*

Предмет дослідження: Форми ферментних препаратів глюканаз, продуценти, штами продуцентів, поживні середовища, індуктори, ферментація, концентрація.

Потужність підприємства в умовних тонах на рік (G_T) - 85

Кількість робочих днів у рік ($T_{рд}$) - 308

4. Перелік питань, які потрібно розробити

Вступ

РОЗДІЛ 1 Огляд літератури

РОЗДІЛ 2 Техніко-економічне обґрунтування технології

РОЗДІЛ 3 Технологія отримання бета-глюканази

РОЗДІЛ 4 Продуктивний розрахунок і матеріальний баланс одержання бета-глюканази

РОЗДІЛ 5 Охорона праці та довкілля

РОЗДІЛ 6 Оцінка економічної ефективності впровадження удосконаленої технології

Висновки

Список використаних джерел

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)

1. Принципова поетапна технологічна схема отримання бета-глюканази.

2. Апаратурна схема виробництва бета-глюканази.

3. Ферментер.

4. Зведені результати економічних розрахунків.

6. Консультанти по роботі, із зазначенням розділів роботи, що стосуються їх

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Розділ 6 Оцінка економічної ефективності впровадження удосконаленої технології	Самофатова В.А., проф.	<u>ПІДПИСАНО</u>	<u>ПІДПИСАНО</u>

7. Дата видачі завдання

«27» січня 2026 року

Керівник

підписано Олена КАНАНИХІНА
(підпис)

Завдання прийняла до виконання

підписано Валентин КУРПІЧ
(підпис)

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання	Примітка
Підготування пояснювальної записки			
1	Вступ		
2	РОЗДІЛ 1 Огляд літератури	24.02.2026	виконено
3	РОЗДІЛ 2 Техніко-економічне обґрунтування технології	10.03.2026	виконено
4	РОЗДІЛ 3 Технологія отримання ферментного препарату бета-глюканази	21.04.2026	виконено
5	РОЗДІЛ 4 Продуктивний розрахунок і матеріальний баланс одержання бета-глюканази	28.04.2026	виконено
6	РОЗДІЛ 5 Охорона праці та довкілля	15.05.2026	виконено
7	РОЗДІЛ 6 Оцінка економічної ефективності впровадження удосконаленої технології	22.05.2026	виконено
8	Висновки	25.05.2026	виконено
9	Список використаних джерел	27.05.2026	виконено
Підготування графічного матеріалу			
10	Принципова поетапна технологічна схема отримання ферментного препарату бета-глюканази	06.04.2026	виконено
11	Апаратурна схема виробництва бета-глюканази	20.04.2026	виконено
12	Ферментер	04.05.2026	виконено
13	Оформлення роботи	02.06.2026	виконено
14	Термін подання роботи на кафедру	08.06.2026	виконено
15	Зовнішнє рецензування	24.06.2026	виконено
16	Захист кваліфікаційної роботи	26.06.2026	Згідно графіка

Здобувач-дипломник

ПІДПИСАНО
(підпис)

Валентин КУРПІЧ
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

ПІДПИСАНО
(підпис)

Олена КАНАНИХІНА
(прізвище та ініціали)

Несу відповідальність за ідентичність електронного та друкованого варіантів кваліфікаційної роботи, даю згоду на обробку персональних даних та не заперечую проти розміщення кваліфікаційної роботи на офіційних web-ресурсах ОНТУ.

Підтверджую, що в кваліфікаційній роботі відсутні порушення норм академічної доброчесності.

Здобувач-дипломник ПІДПИСАНО Валентин КУРПІЧ

АНОТАЦІЯ

Тема: «Удосконалення технології ферментного препарату бета-глюканази»

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма: Біотехнології та біоінженерія

Здобувач першого рівня вищої освіти «Бакалавр»: Курпич В.К.

Керівник: доцент Кананихіна О.М.

Ключові слова: біотехнологія, ферментний препарат бета-глюканази

Актуальність: Завдяки своїм фізіолого-біохімічним властивостям глюканаза широко використовується в різних промислових галузях, в тому числі, харчовій, фармацевтичній, а також в біомедичних і біотехнологічних дослідженнях. Найбільший обсяг застосування глюканази у пивоварінні, хлібопеченні, виробництві спирту, соків, при виробництві комбікормів, целюлозно-паперовій, текстильній промисловості. Бета-глюкани ускладнюють фільтрування сусла та пива та погіршують якість готового продукту. Завдяки своїй здатності розщеплювати важкодоступні полісахариди, β -глюканаза широко використовується у пивоварінні для покращення фільтрації сусла та пива.

Мета: Вдосконалення біотехнології одержання ферментного препарату бета-глюканази шляхом культивування *Trichoderma reesei* штам 4 на оновленому поживному середовищі, корегування параметрів процесу культивування та застосування сучасного методу концентрації культуральної рідини.

Завдання роботи :

Об'єкт дослідження: Технологія ферментного препарату бета-глюканази.

Предмет дослідження: Зроблено аналіз наукової літератури щодо виробництва глюканази як харчової добавки, продуцентів глюканаз та способів їх культивування. Зроблено аналіз поживних середовищ, індукторів та інших умов синтезу глюканази. Здійснено продуктовий розрахунок та матеріальний баланс на один цикл ферментації, підібрано необхідне обладнання. Описана технологічна схема удосконаленої технології. Описані принципи охорони праці на підприємстві, розраховано економічні показники та проведено аналіз інвестиційної привабливості проекту.

Дипломний проект представлено пояснювальною запискою та графічною частиною.

Робота обсягом 103 сторінок складається із вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел, що включає 72 найменувань (7 сторінок), 13 рисунків, 17 таблиць та додатків (4 сторінок).

ЗМІСТ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

- 1.1 Значення геміцелюлазних ферментів для живих організмів та в народному господарстві.....9
- 1.2 Джерела отримання β -глюканази.....10
- 1.3 Класифікація та механізм дії β – глюканаз на глюкан.....11
- 1.4 Просторова структура та механізм дії β - глюканаз на глюкан.....17
- 1.5 Фізико-хімічні властивості β – глюканаз.....21
- 1.6 Методи отримання β – глюканаз.....21

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ

- 2.1 Обґрунтування потреби β -глюканази в пивоварінні.....25
- 2.2 Обґрунтування вибору біологічного агенту.....27
 - 2.2.1 Продуценти β -глюканаз.....27
 - 2.2.2 Характеристика біологічного агенту.....30
 - 2.2.3 Розмноження мікроміцетів роду *Trichoderma*.....33
- 2.3 Особливості поживних середовищ і умов культивування для синтезу β -глюканази.....34
- 2.4 Обґрунтування вибору технологічної схеми.....35

РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ β -глюканаз

- 3.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....38
- 3.2 Особливості біосинтезу глюканаз.....40
- 3.3 Біосинтез глюканаз. Основні фактори і параметри що впливають на процес.....43
 - 3.3.1 Поживні середовища для культивування продуцентів глюканаз.....43
 - 3.3.2 Отримання препаратів з глибинних аеробних культур.....46
 - 3.3.3 Отримання посівного матеріалу у виробничих інокуляторах.....48
 - 3.3.4 Ферментація.....48
 - 3.3.5 Виділення ферментів.....49
- 3.4 Отримання товарних форм.....52

РОЗДІЛ 4.ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК І МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ β -ГЛЮКАНАЗНОЇ ДІЇ

- 4.1 Продуктовий розрахунок виробництва ферментного препарату β -глюканази Г20х потужністю 85 умов.тон на рік.....55
- 4.2 Викладення удосконаленого технологічного процесу отримання β -глюканаз штамом *Trichoderma reesei* штаму М-4 (загальні вимоги).....68
- 4.3 Схема постадійного контролю біосинтезу β -глюканази Г20х з *Trichoderma reesei* штам М-4.....74

					КРБ.ХХЕтаБ.1.543-03.1.1				
Зм.	Аркуш	№ докум.	Підпис	Дата	Удосконалення технології ферментного препарату бета- глюканази	Літ.	Аркуш	Аркушів	
Розроб.		Курпич В..	підписано	16.06.26					
Керівник		Кананихіна О.М.	підписано	16.06.26			5	103	
Керівник						ОНТУ 2026			
Зав.кафедр		Капустян А.І.	підписано	16.06.26					

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

5.1	Виробничі фактори, що впливають на навколишнє середовище при виробництві ферментів.....	77
5.2	Методи очищення стічних вод при виробництві ферментів.....	78
5.2.1	Механічні методи усунення забруднень.....	79
5.2.2	Фізико-хімічні методи усунення забруднень.....	80
5.2.3	Біологічні методи усунення забруднень.....	81
5.2.4	Заходи щодо зменшення негативного впливу виробництва ферментів на організм людини.....	82

РОЗДІЛ 6. ОЦІНКА ЕКОНОМІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ВПРОВАДЖЕННЯ УДОСКОНАЛЕНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ

6.1	Техніко-економічне обґрунтування впровадження удосконаленої технології виробництва ферментного препарату β – глюканази.....	85
6.2	Розрахунок інвестицій у проект виробництва ферментного препарату β – глюканази.....	87
6.3	Розрахунок виробничої програми.....	89
6.4	Розрахунок чисельності працівників (основні, допоміжні, управлінський персонал).....	90
6.5	Розрахунок собівартості виробництва ферментного препарату β – глюканази.....	90
6.6	Розрахунок прибутку та чистого прибутку.....	94
6.7	Розрахунок терміну окупності інвестицій.....	94

ВИСНОВКИ	97
-----------------------	----

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	98
---	----

ДОДАТОК А	106
------------------------	-----

Принципова поетапна технологічна схема отримання β-глюканази	106
--	-----

ДОДАТОК Б	107
------------------------	-----

Апаратурна схема отримання β – глюканази	107
--	-----

ДОДАТОК В	108
------------------------	-----

Ферментер Ф-100	108
------------------------------	-----

ДОДАТОК Г	109
------------------------	-----

Зведені результати економічних розрахунків	109
---	-----

ВСТУП

Сучасна біотехнологія активно досліджує та впроваджує ферментативні препарати у різні галузі промисловості — харчову, текстильну, паперову, кормову, а також у сільське господарство. Одним із важливих ферментів є β -глюканаза, яка каталізує гідроліз β -глюкозидних зв'язків у полісахаридах, зокрема у β -глюканах, що містяться у клітинних стінках злакових культур, грибів та деяких мікроорганізмів. Завдяки своїм властивостям β -глюканаза широко використовується для покращення перетравності кормів, у виробництві пива, очищенні текстильних матеріалів та інших технологічних процесах.

У сучасних умовах розвитку біотехнологій зростає інтерес до ферментів, які знаходять широке застосування в різних галузях промисловості, сільського господарства, медицини та екології. Одним із таких біологічно активних агентів є β -глюканаза — фермент, що гідролізує β -глюкозидні зв'язки у β -глюканах. Ці полісахариди є складовими клітинних стінок рослин, грибів і деяких мікроорганізмів, тому β -глюканаза має важливе значення у розщепленні клітинних структур і підвищенні біодоступності поживних речовин.

Завдяки своїм властивостям β -глюканаза широко використовується в харчовій промисловості для покращення фільтрації пива і соків, у текстильній промисловості для обробки тканин, у тваринництві — як кормова добавка, а також у біоенергетиці для гідролізу біомаси з метою отримання біоетанолу.

Технологія отримання β -глюканази ґрунтується на використанні мікроорганізмів-продуцентів, умов культивування, методів екстракції та очищення ферменту. Розробка ефективної та економічно вигідної біотехнологічної схеми виробництва цього ферменту є актуальним завданням для промислової біотехнології.

У пивоварній промисловості ферменти відіграють ключову роль у підвищенні ефективності технологічного процесу та покращенні якості кінцевого продукту. Одним із важливих ферментів, які широко використовуються у виробництві пива, є β -глюканаза — фермент, що

розщеплює β -глюкани, складні полісахариди, які містяться у клітинних стінках зерна, особливо ячменю.

Наявність значної кількості β -глюканів у пивному суслі може спричинити підвищення в'язкості, ускладнити фільтрацію та знизити стабільність пива. Тому додавання β -глюканази на стадії затирання сприяє ефективнішому розщепленню цих сполук, покращенню фільтрації та зменшенню технологічних втрат.

Одним із найперспективніших продуцентів β -глюканази є гриб *Trichoderma reesei*, відомий своєю високою здатністю до синтезу гідролітичних ферментів, особливо целюлаз та геміцелюлаз. Цей мікроорганізм не лише ефективно продукує ферменти, але й легко піддається генетичним модифікаціям, що дозволяє підвищувати рівень продукції β -глюканази та змінювати її властивості відповідно до потреб виробництва.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Значення геміцелюлазних ферментів для живих організмів та в народному господарстві

Бета-глюканаза часто розглядається в комплексі з ферментами, які розщеплюють геміцелюлозу, або як частина геміцелюлазного комплексу. Фермент розбиває β -глюкани (компоненти геміцелюлози) в'язкого полімеру до низько в'язких ізомальтози і мальтотріози.

Геміцелюлази виконують низку функцій у живих організмах та є промислово важливими ферментами, які займають значну частку світового ринку промислових ферментів і демонструють великі перспективи комерційного застосування.[1]

Так, в рослинах β -глюканази беруть участь в процесах росту, диференціації тканин, захисній реакції проти патогенів, а також у модифікації клітинної стінки під час проростання насіння.

У мікроорганізмів вони забезпечують живлення через розщеплення глюканів доквілля, допомагають у взаємодії з іншими мікроорганізмами або хазяїном.

У тварин, комах — беруть участь у перетравленні рослинної клітковини та патогенному руйнуванні клітин рослин-господарів.[1]

При переробці рослинної сировини її обробляють геміцелюлазними ферментами. За допомогою геміцелюлаз можна отримати глюкозу та пентози, які можуть використовуватися для виробництва білкових препаратів у кормовиробництві; геміцелюлози використовуються для одержання ксиліту, фурфуролу, етанолу, біогазу ті інших продуктів мікробіологічного синтезу.

Ефект від використання геміцелюлаз полягає в тому, що вони дозволяють підвищити вихід низки традиційних продуктів без додаткових витрат на сировину за рахунок появи додаткових резервних сахарів в результаті гідролітичного розщеплення геміцелюлоз сировини.

Завдяки своїй здатності розщеплювати важкодоступні полісахариди,

β -глюканаза широко використовується:

- у пивоварінні для покращення фільтрації суслу та пива;[2]

- у хлібопеченні для покращення текстури та збільшення об'єму хлібобулочних виробів шляхом ферментативної обробки злакових компонентів;
- у виробництві соків для зменшення в'язкості соків та покращення прозорості;
- при виробництві комбікормів для покращення засвоєння поживних речовин, особливо у свиней і птахів;[3]
- для поліпшення обробки деревини та біомаси у целюлозно-паперовій промисловості;
- при виробництві біоетанолу - важливого відновлюваного пального;
- у фармацевтиці та біомедицині для розщеплення β -глюканів у клітинних стінках патогенних грибів як частини антимікробної терапії, а також при використанні у створенні імуномодулювальних препаратів [4, 5, 6, 7].

Таким чином, β -глюканаза є ключовим ферментом у біотехнології, який поєднує фундаментальну біологічну функцію з багатогалузевим практичним застосуванням. Її універсальність та доступність зумовлюють високий інтерес до вдосконалення технологій її отримання.

1.2 Джерела отримання β -глюканази

β -глюканаза природно синтезується різними живими організмами, зокрема мікроорганізмами, грибами, рослинами і деякими тваринами. Основними джерелами для промислового отримання ферменту є мікроорганізми, завдяки високій швидкості росту, простоті культивування та здатності до генетичної модифікації [2].

Мікроорганізми — найпоширеніше джерело β -глюканази в біотехнології.

Певні представники плісенивих грибів продукують комплексні ферментні системи, включно з β -1,3- і β -1,4-глюканазами. Деякі бактерії, продуценти глюканаз, мають високу стійкість до температури та рН, що робить їх ферменти придатними для жорстких технологічних умов. Дріжджі хоча й продукують менші кількості β -глюканази, відіграють певну роль у переробці клітинних стінок і часто використовуються у пивоварінні.

Вищі гриби (вешенка) також продукують β -глюканази під час розкладу деревної біомаси. Патогенні гриби синтезують ці ферменти для проникнення в клітини хазяїв (рослин або тварин), руйнуючи їхні клітинні стінки.

У вищих рослин β -глюканази активуються під час проростання насіння та виконують захисну роль проти патогенів. У злакових культурах (пшениця, ячмінь, овес) ці ферменти відповідають за модифікацію клітинної стінки, а також регулюють ріст тканин.

Деякі комахи, які споживають деревину або рослини, мають у своєму шлунково-кишковому тракті мікробіоту або власні β -глюканази, що допомагають розщеплювати глюкани [3].

1.3 Класифікація та механізм дії β – глюканаз на глюкан

β -глюканаза (β -1,3- або β -1,4-глюканаза) — це гідролітичний фермент, що каталізує розщеплення β -глюкозидних зв'язків у β -глюканах — природних полісахаридах, до складу яких входить глюкоза, з'єднана β -глікозидними зв'язками. Ці субстрати є структурними компонентами клітинних стінок рослин, грибів, водоростей та деяких бактерій [1].

В зернових культурах та бактеріях β - глюкани містять розгалужені полісахариди з β -D-глюкози, зв'язаних через (1→3)(1→4) глікозидні зв'язки (рис.1.1) [8].

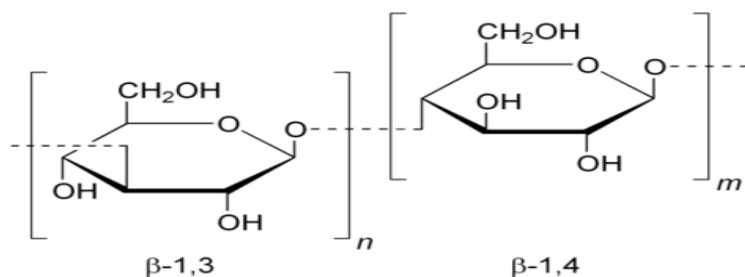


Рис. 1.1. Будова зернового β - глюкана

Глюкозні залишки β -глюканів зв'язані головним чином через два або три послідовні β -(1,4) зв'язки, які розділяє одиничний β -(1,3) зв'язок. Рідше зустрічаються довші відрізки послідовно зв'язаних глюкозних залишків через β -(1,4) зв'язки з ступенем полімеризації від 5 до 28.

У грибів β - глюкани утворюються через (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) глікозидні зв'язки (рис.1.2).[9]

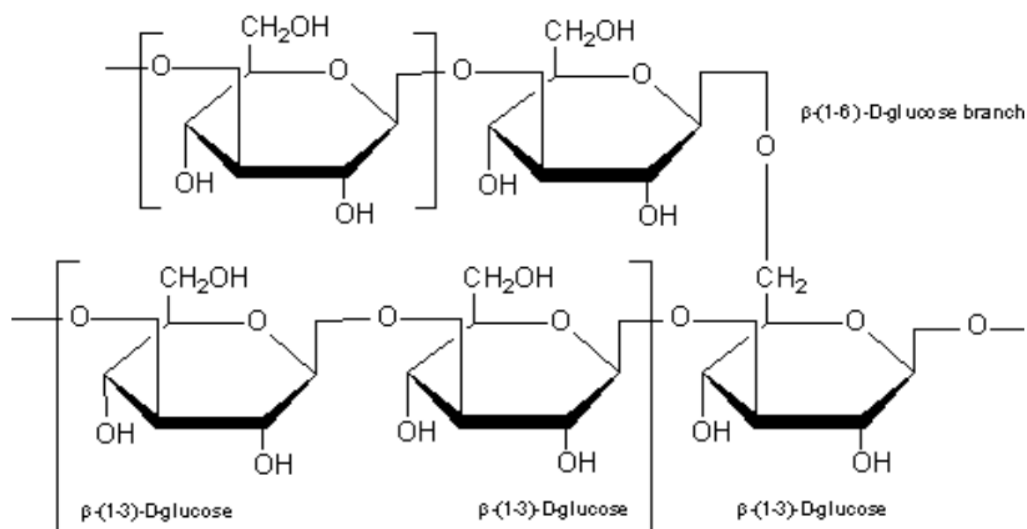


Рис.1.2 Будова грибкового β -глюкана

Міжнародний біохімічний союз (IUBMB) у 1961 році поділив ферменти на шість класів. В основу цієї класифікації був покладений тип каталітичної реакції та 712 відомих на той момент ферментів, які були розділені на шість класів.

Відповідно до цієї класифікації ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканази (КФ 3.2.1.39) були віднесені до класу гідролаз, що розщеплюють β -(1 $\rightarrow$ 3)-глікозидні зв'язки в (1 $\rightarrow$ 3)- β -D- глюканах (КФ3.2.1.x).

Каталізована хімічна реакція є тією специфічною ознакою, за якою один фермент відрізняється від іншого. Тому класифікація і номенклатура ферментів ґрунтується на цьому принципі. Сучасна класифікація ферментів (шифр – КФ – класифікація ферментів або ЕС – Enzym Comission Code) розроблена спеціальною Комісією Міжнародного Біохімічного Союзу.

У основі класифікації лежать три положення:

- 1) усі ферменти поділять на 6 класів за типом каталізованої реакції;
- 2) кожен фермент отримує систематичну назву, що включає назву субстрату, тип каталізованої реакції, і закінчення "аза"; крім того, Комісією

були збережені і узаконені тривіальні назви. Таким чином, виникла подвійна система найменування ферментів;

3) кожному ферменту привласнюється чотиризначний шифр (код). Перше число вказує на клас ферментів, друге – підклас, третє – підпідклас, четверте – порядковий номер ферменту в підпідкласі [10].

Всі ферменти включені в «Каталог ферментів» під своїм *класифікаційним номером* (КФ), що складається з чотирьох цифр.

Ферменти класифікуються не як індивідуальні речовини, а як каталізатори певних хімічних перетворень або груп хімічних перетворень. Ферменти, виділені з різних біологічних джерел і каталізують ідентичні реакції, можуть досить істотно відрізнятися за своєю структурою, проте всі вони в переліку класифікованих ферментів фігурують під одним шифром.

Ендо-(1→3)-β-D-глюканази належать до 3-го класу ферментів — гідролаз, підкласу 3.2 (глікозилази — ферменти, що розщеплюють глікозидні зв'язки), підпідкласу 3.2.1 (глікозидази, або гідролази О- та S-глікозильних сполук). Ці ферменти мають шифр **КФ 3.2.1.39** (відповідно до номенклатури IUBMB).

Ендо-(1→3)-β-D-глюканази поділяються на три групи, кожній з яких надано власний номер міжнародної класифікації:

- 1) ендо-(1→3); (1→4)-β-D-глюканази (КФ 3.2.1.6), що каталізують розщеплення не тільки β-(1→3)- зв'язку, але також β-(1→4) - зв'язки, прилеглі до тієї сторони β-(1→3)-зв'язків, яка ближче до відновлювального кінця в (1→3);(1→4)-β-D-глюканах;
- 2) ліхенази (КФ 3.2.1.73), що каталізують розщеплення β-(1→4)- зв'язків у (1→3); (1→4)-β-D-глюканах;
- 3) ендо-(1→3)-β-D-глюкозидази (КФ 3.2.1.39), які специфічні до β- (1→3)- зв'язків глюканів і вимагають наявності щонайменше двох суміжних β- (1→3)- зв'язків для розщеплення глікозильних зв'язків.

Ендо-(1→3)-β-D-глюканази дійсно неоднорідні за своїм механізмом дії та субстратною специфічністю, тому в класифікації IUBMB вони розділені на три

окремі позиції залежно від того, які саме зв'язки та в яких молекулах вони розривають (табл.1.1):

1. КФ 3.2.1.39 (Власне ендо-1,3-β-глюканаза)

- **Субстрати:** Ламінарин, пахіман, парамілон.
- **Дія:** Гідролізує внутрішні (1→3)-β-D-глікозидні зв'язки в глюканах, що складаються виключно або переважно з таких зв'язків.
- **Особливість:** Не діє на змішані зв'язки (наприклад, 1,3-1,4) так ефективно, як специфічні ліхенази.

2. КФ 3.2.1.6 (Ендо-1,3(4)-β-глюканаза)

- **Субстрати:** β-глюкани зернових (ячменю, вівса), ламінарин, ліхенін.
- **Дія:** Цей фермент здатний розщеплювати (1→3)- або (1→4)-β-зв'язки, **якщо** за зв'язком, що розщеплюється, йде (1→3)-зв'язок.
- **Біотехнологічне значення:** Саме цей фермент найчастіше використовується в пивоварінні для руйнування в'язких β-глюканів ячменю.

3. КФ 3.2.1.73 (Ендо-1,3-1,4-β-глюканаза, або ліхеназа)

- **Субстрати:** Ліхенін та β-глюкани злакових.
- **Дія:** Діє виключно на (1→4)-β-зв'язки в тих полісахаридах, де вони чергуються з (1→3)-зв'язками.
- **Специфічність:** Вона "впізнає" певну послідовність зв'язків і робить розріз у специфічному місці змішаного ланцюга.

Вибір конкретної групи ферментів залежить від завдання: наприклад, для отримання дріжджового екстракту (руйнування клітинної стінки) потрібен фермент **3.2.1.39**, а для фільтрації пивного сусла — **3.2.1.6** або **3.2.1.73..**

Табл. 1.1 - Порівняльна таблиця груп ферментів

Номер КФ	Назва	Основна мішень
3.2.1.39	Ендо-1,3- β -глюканаза	Чисті (1 $\rightarrow$ 3)- β -глюкани (ламінарин)
3.2.1.6	Ендо-1,3(4)- β -глюканаза	Змішані зв'язки (універсальна дія)
3.2.1.73	Ліхеназа	(1 $\rightarrow$ 4)-зв'язки в змішаних глюканах

Класифікація глікозидгідролаз CAZY (Carbohydrate Active Enzyme, www.cazy.org) ґрунтується на порівнянні послідовностей амінокислот у молекулах білків. У разі глікозидгідролаз таке порівняння дозволяє розділити їх більш ніж на 100 сімейств. Кожне сімейство містить білки, подібні за первинною та вторинною структурою. Ця класифікація застосовується лише до ферментів із встановленою первинною структурою. CAZY дозволяє класифікувати білки, для яких відсутні дані про біохімічні властивості, при цьому потрібно пам'ятати, що сама належність ферменту до певного структурного сімейства не дає робити висновки про його каталітичні властивості [11, 12].

Згідно з класифікацією CAZY наразі налічується 173 сімейства глікозидгідролаз, розділених на 18 кланів. Клани – це групи сімейств, які мають загальний та каталітичний механізм. Нині вони визначені тільки для глікозидгідролаз.

Сімейство 16 глікозидгідролаз є одним з найбільш поліспецифічних, оскільки об'єднує ферменти, здатні каталізувати гідроліз цілого спектра вуглеводів, таких як кератансульфати, (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюкани, змішані (1 $\rightarrow$ 3(4))- β -D-глюкани, ксилоглюкани, к-карагенани, агарозу.

Сімейство включає наступні групи ферментів згідно з IUPAC класифікації:

1. ксилотрансферази (КФ 2.4.1.207) - це ключові ферменти апопласту рослин, які відіграють критичну роль у модифікації клітинної стінки, забезпечуючи її ріст, розтягування та структурну перебудову. Згідно з міжнародною класифікацією, вони належать до класу трансфераз. У харчовій промисловості – це регулювання текстури овочів та фруктів під час зберігання, створення сортів рослин зі підвищеною стійкістю до вилягання.
2. ендо- β -галактозидази (КФ 3.2.1.103) - це специфічний гідролітичний фермент, який відіграє ключову роль у розщепленні складних вуглеводів. Він розщеплює внутрішні β -галактозидні зв'язки всередині полісахаридних ланцюгів. Бере участь у деградації клітинних стінок рослин, розщеплюючи компоненти ксилотрансферази. Зустрічається у деяких видів бактерій, що дозволяє їм утилізувати складні глікозиди. Дефіцит подібних ферментів в організмі людини може бути пов'язаний з мукополісахаридозами.
3. ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканази (КФ 3.2.1.39) – це ферменти, що спеціалізуються на розщепленні лінійних β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканів. Їх також часто називають ламінариназами. Ці ферменти здійснюють ендогідроліз внутрішніх глікозидних зв'язків. Механізм дії — розриває зв'язки всередині ланцюга, перетворюючи високомолекулярні полімери на коротші олігосахариди. Відіграють критичну роль у захисті від патогенних мікроорганізмів та в метаболізмі вуглеводів у мікроорганізмів.
4. ендо-(1 $\rightarrow$ 3(4))- β -D-глюканази (КФ 3.2.1.6) – вони спеціалізуються на розщепленні змішаних β - глюканів, які є характерними для зернових культур. Визначено фізико-хімічні та каталітичні характеристики ферменту, відповідно до яких він може застосовуватися у процесах, що передбачають руйнування клітинних стінок багатьох мікробних та рослинних продуцентів. Використовуються для гідролізу рослинної сировини.

5. ліхенази (КФ 3.2.1.73) – це ферменти, які належить до класу гідролаз, що розщеплюють глікозидні зв'язки.
Ліхенази специфічно гідролізують 1,3-1,4- β -D-глюкани (ліхенін - основний полісахарид деяких лишайників). В результаті дії ферменту утворюються олігосахариди. Ліхенази широко використовуються в біотехнології, зокрема для аналізу структури полісахаридів.
6. агарози (КФ 3.2.1.81) – це ферменти, що належать до класу гідролаз, які розщеплюють полісахарид агар (або агарозу) шляхом гідролізу β - 1,4-глікозидних зв'язків до олігосахаридів. Виробляються переважно морськими бактеріями та деякими водоростями. Використовуються для виділення фрагментів ДНК з агарозних гелів після електрофорезу. Створення рідких середовищ з агаровмісної сировини.
7. карагінази (КФ 3.2.1.83) –це ферменти (ендо- β -1,4-галактанази), які розщеплюють карагінани (полісахариди червоних водоростей) на менші фрагменти (олігосахариди). [13, 14] Переважно продукуються морськими бактеріями, які використовують водорості як джерело вуглецю. Використовуються для модифікації в'язкості продуктів, у фармакології та медицині, виробництво функціональних продуктів, харчової та косметичної промисловості (завдяки біологічній активності олігосахаридів) [14, 15].
8. ксілоглюканази (КФ 3.2.1.151) – це, що належать до класу глікозил-гідролаз. Вони спеціалізуються на розщепленні ксілоглюкану — основного геміцелюлозного полісахариду первинних клітинних стінок вищих рослин [16, 17]. Вони каталізують еногідроліз внутрішніх β -1,4-глюкозидних зв'язків у головному ланцюзі ксілоглюкану. Також містяться в самих рослинах, де беруть участь у модифікації клітинної стінки під час росту та дозрівання плодів [18].

1.4 Просторова структура та механізм дії β - глюканаз на глюкан

β -глюканази бактерій і тварин належать переважно до 16 сімейства

О-глікозидгідролаз, що характеризується просторовою структурою β -глюканази, в якій стійкість білкової глобули підтримується структурою, подібною до гіперболічного параболоїда. Зокрема, дослідження просторової структури β -глюканази з *Bacillus amyloliquefaciens* методом моделювання з гомології [19].

Більшість β -глюканаз мають глобулярну структуру. Вони часто складаються з одного каталітичного домену, але можуть містити додаткові вуглевод-зв'язувальні модулі (СВМ), які допомагають ферменту «прикріпитися» до субстрату. β -глюканази часто є мультидоменними. Окрім каталітичного центру, вони мають СВМ-домен, з'єднаний гнучким лінкером.

Дослідження просторової структури $(1\rightarrow3)$ - β -глюканази методом моделювання з гомології [20] показало, що досліджувана глюканаза має 94% ідентичність з $(1\rightarrow3);(1\rightarrow4)$ - β -D-глюканазою.

Ця структура формує каталітичну порожнину за типом клешні (рис.1.3).

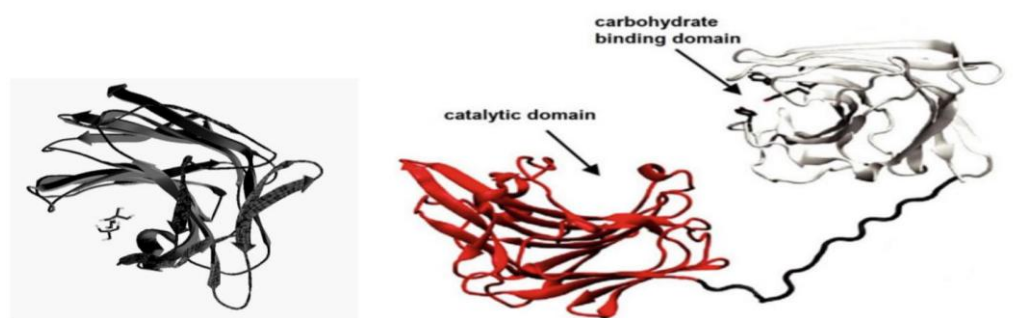


Рис. 1.3 Просторова взаємодія ендо- $(1\rightarrow3)$ - β -D-глюканази з субстратом

Рис.1.4 Структура білка

Вони мають сегментарну структуру (рис.1.4), що складається з каталітичного домену та одного або двох некаталітичних доменів, причому деякі з них, як, наприклад, вуглеводний домен, беруть участь у зв'язуванні субстрату [21].

Активні центри поділяються на кишенькові або кратерні, щілинні або канавчасті та тунельні (рис.1.5).

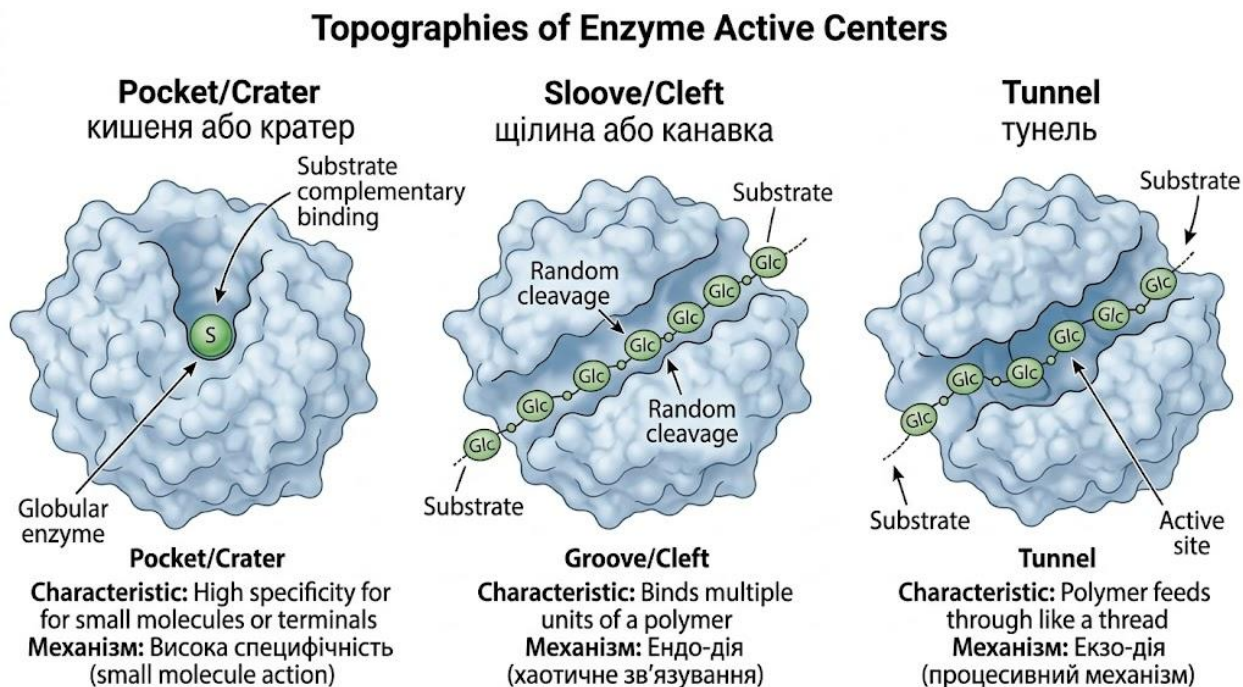


Рис.1.5 Topographies of Enzyme Active Centers

Кишеня або кратер. Ця структура нагадує глибоке заглиблення або «лунку» на поверхні білкової глобули. Субстрат повністю занурюється в цю кишеню. Така форма обмежує доступ до активного центру, дозволяючи входити лише невеликим молекулам або кінцевим групам великих молекул. Найчастіше зустрічається у ферментах, що перетворюють поодинокі цукри або невеликі органічні сполуки. Глибоке занурення субстрату в «кратер» дозволяє ізолювати хімічну реакцію від впливу навколишнього середовища (наприклад, від води або сторонніх йонів).

Тунель — це високоспеціалізована форма активного центру, де каталітична кишеня розташована всередині закритого каналу, сформованого петлями білкової молекули (рис. 1.5). Така будова характерна для ферментів, що працюють за екзо-механізмом, зокрема для екzogлюканаз. Всередині тунелю створюється унікальне мікросередовище. Полімерний ланцюг виривається з кристалічної решітки (наприклад, із волокна целюлози) і надійно фіксується,

що дозволяє ферменту діяти на важкодоступні зв'язки, захищаючи проміжні продукти від сторонніх реакцій. У виробництві біопалива або переробці відходів сільського господарства саме екzogлюканази з тунельною структурою забезпечують глибоку переробку сировини до простих цукрів. У природних системах тунельні ферменти працюють у парі з «щілинними» (ендо-ферментами). Ендо-ферменти створюють нові вільні кінці в полімері, а тунельні ферменти «захоплюють» ці кінці.

На відміну від "тунельних" структур, **щілина** є відкритою для доступу довгого полімеру зверху або збоку. Це дозволяє ферменту захоплювати випадкові сегменти субстрату, що призводить до швидкого розриву внутрішніх зв'язків і різкого зниження в'язкості розчину.. Активна структура у формі щілини або канавки характерна для ферментів, які мають розщеплювати довгі полімерні ланцюги всередині, а не з кінців. Саме форма відкритої щілини дозволяє β -глюканазам діяти як "ендо"-ферменти. Оскільки β -глюкани (наприклад, у ячмені або клітинних стінках грибів) мають звивисту, часто нерегулярну структуру, форма щілини є найбільш універсальною. Канавка зазвичай пролягає через усю поверхню глобули ферменту. Вона вистелена амінокислотними залишками, які утворюють численні слабкі зв'язки з цукровими одиницями, стабілізуючи полімер у потрібному положенні (рис.1.6).

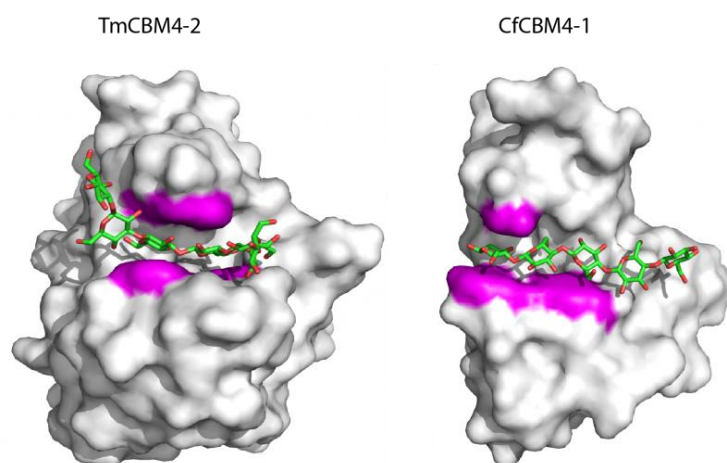


Рис.1.6 U-подібна конформація зв'язування TmCBM4 та лінійна щілина CfCBM4.

U-подібна конформація зв'язування TmCBM4 (PDB ID 1GUI), який зв'язує β -1,3-глюкан, та лінійна щілина CfCBM4 (PDB ID 1GU3), яка розпізнає β -1,4-глюкани. Збережені ароматичні залишки показані пурпуровим кольором, а вуглець лігандів – зеленим.

1.5 Фізико-хімічні властивості β -глюканаз

Значення оптимального рН для бактеріальних глюканаз складають від 5,5 до 6,0; більшість грибних β -D-глюканаз мають оптимальне значення рН в слабкокислому діапазоні (3,8-6,0) [22], рідко – в нейтральному або слабколужному діапазоні [23].

Температурний оптимум складає від 50–60 °С для грибних глюканаз і до 40–50 °С для глюканаз, отриманих із інших джерел [24]. Глюканаз грибів стабільні в широкому діапазоні температур 0–70°С [25].

1.6 Методи отримання β - глюканаз

Вилучення з природних джерел. В цьому методі використовують природні джерела (наприклад, зерно, плоди грибів) для вилучення β -глюканаз. Фермент вилучають за допомогою різних методів, таких як екстракція або деструкція клітинних стінок. Для вилучення β -глюканаз з природних джерел (бактерії, гриби) застосовуються різні методи. Один з них - це метод екстракції, який включає в себе фізичні та хімічні методи розриву клітинного матеріалу, що містить β -глюканазу, і виділення ферменту з отриманої суміші [26]. Наприклад, при отриманні β -глюканаз з бактерії *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* методика виділення базується на ультразвуковому руйнуванні клітин та сепарації центрифугуванням. Після проведення хроматографічного очищення рівень активності отриманого ферменту було підтверджено спектрофотометрично.

Глибинна ферментація (ГФ) є найбільш технологічним і поширеним у світі методом промислового отримання β -глюканаз. На відміну від поверхневого культивування, процес відбувається у всьому об'ємі рідкого поживного середовища всередині спеціальних апаратів — ферментерів. Цей метод має

перевагу - завдяки оптимізації середовища можна досягти максимального виходу ферменту. Процес передбачає культивування мікроорганізмів-продуцентів у товщі рідкого поживного середовища за умов інтенсивного перемішування та аерації.

Поверхнева ферментація (ПФ): цей метод також використовує мікроорганізми, але замість рідкого середовища вони ростуть на твердих субстратах, таких як зерно, солома. На відміну від глибинного методу, тут мікроорганізми розвиваються на поверхні вологого твердого субстрату або в тонкому шарі рідкого середовища, маючи прямий контакт з атмосферним киснем.

Мікроорганізми виробляють фермент на субстраті, який потім слід очищувати. Оскільки β -глюканаза є індукованим ферментом, субстрат одночасно слугує і джерелом живлення, і стимулятором біосинтезу. Найчастіше використовують пшеничні або ячмінні висівки, солодові паростки, які багаті на азотисті речовини та вітаміни, подрібнене кукурудзяне зерно чи овес, як додаткові джерела вуглецю.

Вибір поверхневої (твердофазної) ферментації для отримання β -глюканази часто обґрунтований економічною ефективністю [27]. Використовуються вторинні продукти сільського господарства (пшеничні висівки, солом'яне різання, лушпиння), що значно знижує собівартість поживного середовища. Поверхнева ферментація не вимагає постійного енергоємного перемішування та потужної примусової аерації рідкої фази, що є основною статтею витрат у біореакторах [28]. Поверхнева ферментація дозволяє виробляти більш концентровані форми ферменту, оскільки мікроорганізми виробляють фермент на поверхні субстрату, а не у рідині. Це дозволяє отримати первинний екстракт з активністю, що в рази перевищує активність культуральної рідини при глибинному способі. Твердий залишок після екстракції ферменту є цінним високобілковим кормом, збагаченим вітамінами та мікробною біомасою.

В екстрактах після ПФ концентрація β -глюканаз часто вища, ніж у нативній рідині після глибинної ферментації (табл.1.2)

Табл. 1.2 - Порівняння ПФ та ГФ для отримання β -глюканаз

Характеристика	Поверхнева ферментація (ПФ)	Глибинна ферментація (ГФ)
Основні продуценти	Плісняві гриби	Бактерії, дріжджі, гриби
Потреба в кисні	Забезпечується природно (дифузія)	Потребує примусової аерації
Контроль параметрів	Складний	Високоточний, автоматизований
Тип препарату	Зазвичай комплексні (мультиензимні)	Часто вузькоспецифічні

Генетична інженерія це найбільш прогресивний напрям у виробництві β -глюканаз. Він дозволяє обійти природні обмеження мікроорганізмів, такі як низька продуктивність, чутливість до температур або синтез небажаних побічних ферментів. Вона відкрила можливість отримувати β -глюканазу з покращеними властивостями (термостабільність, стійкість до рН) та значно вищим виходом продукту (табл.1.3). Ген, що відповідає за виробництво ферменту, вводять в ДНК мікроорганізму, після чого він починає виробляти β -глюканазу. Отримання ферменту β -глюканаз за допомогою генетичної інженерії базується на використанні рекомбінантних ДНК-технологій для введення гену, що кодує β -глюканазу, в клітини-хазяїна. Основна ідея полягає у створенні штамів-суперпродуцентів, які синтезують цільовий фермент у кількостях, недоступних для диких штамів. Генетична інженерія дозволяє не просто копіювати природні ферменти, а змінювати їх. Для отримання β -глюканаз за допомогою генетичної інженерії використовують різноманітні мікроорганізми, такі як бактерії, дріжджі та гриби. Ген, що кодує β -глюканазу, ізолюється з геномів різних організмів і вводиться в плазмиду або геном мікроорганізму, який використовується для виробництва ферменту. Після цього проводиться трансформація клітин мікроорганізму з метою включення гену β -глюканаз в їх ДНК [29].

Табл.1.3 - Переваги генетичної інженерії

Перевага	Опис
Чистота продукту	Можна змусити клітину синтезувати <i>тільки</i> β -глюканазу без домішок протеаз або амілаз, які можуть псувати кінцевий продукт.
Економічність	Вихід ферменту в рекомбінантних штамів може бути в 10–100 разів вищим, ніж у природних.
Секреція	Фермент можна "навчити" виходити за межі клітини прямо в розчин, що значно спрощує його вилучення.
Універсальність	Можливість отримання ферментів, які в природі існують лише у важкодоступних або небезпечних організмів.

Одним з методів генетичної інженерії є рекомбінантна ДНК-технологія. За допомогою цієї технології можна отримати поживні середовища, що містять рекомбінантні бактерії, які виробляють β -глюканазу. Такі поживні середовища забезпечують ефективний та швидкий процес виробництва ферменту з високим виходом [30]. Штам-продуцент можна налаштувати так, щоб він синтезував тільки β -глюканазу без супутніх протеаз, які можуть руйнувати цільовий продукт. Рекомбінантні β -глюканази часто ефективніше працюють із високов'язкими субстратами (наприклад, ячмінним суслом), що пришвидшує фільтрацію. Таким чином, генетична інженерія перетворила отримання β -глюканаз із випадкового природного процесу на високоточне біотехнологічне виробництво.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ

2.1. Обґрунтування потреби β -глюканази в пивоварінні

Фермент бета-глюканаза є обов'язковим учасником технологічних процесів різних галузей народного господарства. Бета-глюканаза ефективно використовується у пивоварінні, хлібопеченні, виробництві спирту, соків, при виробництві комбикормів, целюлозно-паперовій, текстильній промисловості.

Бета-глюкани це полісахаридами, що містяться в рослинній сировині, у крохмальному ендоспермі зерна, в оболонках зерна ячменю або вівса. Бета-глюкани ускладнюють фільтрування суслу та пива та погіршують якість готового продукту. β -глюканази необхідні також при переробці зернових культур жита, ячменю, вівса, які містять значну кількість слизу і інших драгледоподібних речовин та характеризуються високим вмістом ксиланів, β -глюканів, інших полісахаридів некрохмального походження.

Основною сировиною для виробництва пива є ячмінний солод. Щоб забезпечити процес затирання при виробництві пива, кількість ферментних препаратів повинна забезпечити гідроліз біополімерів зернових культур. Залежність кількості ферментного препарату, який вносять, від кількості несолодженого ячменю в заторі встановлюють експериментально.

Статистичних даних у потребі ферментів β - глюканаз на підприємствах України у літературі не знайдено. Потребу у цьому ферментному препараті розраховували виходячи з даних про об'єми пива, що виробляється в Україні.

Згідно з повідомленням генерального директора ПрАТ «Укрпиво» Коренькової Г.М. [31] експертна оцінка обсягу виробництва пива по Україні (крім пива безалкогольного з умістом спирту до 0,5 об. %) за 12 місяців 2024 року склав – 140,0 млн. дал, та становить 104,8 % до аналогічного періоду 2023 року. У той же час зазначений показник становить лише – 82,4 % до обсягів виробництва 12-ти місяців 2021 року. за 12 місяців 2024 року становила – 140 млн. дал, 140 млн дал (1,4 млрд л)

Згідно [32] зі 100 кг зернової сировини можна отримати – 524,52 л пива, тобто 52,5 дал. Якщо у 2024 році було отримано 140 млн дал. пива, то кількість сировини на його виробництво складатиме – 267 000 000 кг. На 1 кг загальної зернової маси для виробництва пива потрібно – 0,01 % ферментного препарату, звідки загальна потреба для усіх виробників пива складає – 2 670 000 кг або 2 670 т.

Наразі чотири гравці контролюють близько 80-85% ринку пива в Україні [33].

№	Назва підприємства	Бренди	Дохід, грн	Прибуток, грн
1	ПАТ «Абінбев Ефес Україна»		4,6 млрд	-811 млн
2	ПрАТ «Карлсберг Україна»		10,8 млрд	1,8 млрд
3	ПрАТ «Оболонь»		10,7 млрд	1,8 млрд
4	ТЗОВ «Перша приватна броварня»		2 млрд	-25,5 млн

Рис.2.1 Виробники-лідери пива в Україні

Потреба для таких виробників складає орієнтовно 2 136 т.

Згідно доходам, потреба в зерновій сировині ПАТ «Абінбев Ефес Україна» орієнтовно становить 24 % або 512 т.

При виготовленні деяких найменувань пива, як було сказано вище, передбачено застосування несолоджених матеріалів, кількість яких може коливатись залежно від сорту пива від 15 % до 50 %. Якщо для виготовлення пива використовується солод та несолоджена сировина у співвідношенні 5 : 1, потреба у загальній кількості ферменту зменшується і становить

$$512 : 6 = 85,33 \text{ т на рік.}$$

2.2 Обґрунтування вибору біологічного агенту

2.2.1. Продуценти β -глюканаз

У промисловій біотехнології одержання β -глюканаз (ендо-1,3- β -глюканазу, ендо-1,4- β -глюканазу) базується на використанні мікроорганізмів-продуцентів, які поділяють на три основні групи:

- мікроскопічні гриби,
- бактерії
- дріжджі.

Кожна група має свої кінетичні, температурні та рН-характеристики, що визначає сферу застосування отриманих ферментів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 - Порівняльна характеристика промислових продуцентів β -глюканаз

Продуцент	Тип ферментного комплексу	Оптимум рН	Оптимум температури, °С	Головна сфера застосування
<i>Trichoderma reesei</i>	Мультиферментний (з целюлазами)	4.5 – 5.5	50 – 55	Кормовиробництво, гідроліз біомаси
<i>Aspergillus niger</i>	Комплексний (з пектиназами)	4.0 – 5.0	55 – 60	Пивоваріння, сокова промисловість
<i>Aspergillus oryzae</i>	Мультиензимний гідролітичний комплекс (переважно амілолітична та протеолітична спрямованість)	3,5–5,0	30–32	Хлібопечення, ферментація сої
<i>Bacillus subtilis</i>	Моноферментний	6.0 – 7.5	50 – 65	Спиртова промисловість, хлібопечення
<i>Pichia pastoris</i> (рекомбінант)	Високоочищений цільовий білок	Залежить від гену	50 – 60	Промислове виробництво рекомбінантних білків
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (рекомбінант)	Вузькоспрямований монокомпонентний (або бікомпонентний) комплекс	Залежить від гена	28–30	Виробництво рекомбінантних білків, спирту, хлібопечення

Бактерії є однією з найважливіших груп промислових продуцентів ферменту β -глюканази - представники роду *Bacillus*. Порівняно з мікроскопічними грибами бактеріальні продуценти мають кілька технологічних переваг: висока швидкість росту (бактеріальна ферментація зазвичай триває значно менше 24–48 годин замість 72–120 годин у грибів), простота культивування, термостабільність ферментів (багато бактеріальних β -глюканаз зберігають активність за високих температур, що є критично важливим для пивоваріння та спиртової промисловості) [34, 35, 36].

Використання **дріжджів** як продуцентів ферменту β -глюканази має різні напрямки, в тому числі в пивоварінні та спиртовій промисловості. У природному вигляді дріжджі *Saccharomycopsis fibuligera*, *Rhodotorula* виробляють β -глюканазу в мізерних кількостях, вони нездатні ефективно зброджувати мальтозу та накопичувати високі концентрації етанолу, виділяють супутні метаболіти (пігменти, леткі кислоти, сивушні олії), які повністю псують смаковий та ароматичний профіль напою, тому в промисловості використовують рекомбінантні (генетично модифіковані) штами [37, 38, 39].

Автори [37] розглядають роди *Rhodotorula* та *Saccharomycopsis* у класичному пивоварінні як контамінанти (шкідники), які продукують каротиноїди, що змінюють колір, і синтезують значну кількість ефірів та сивушних олій, які руйнують букет напою.

Грибні продуценти є основними постачальниками β -глюканаз для кормової, пивоварної та сокової промисловості. Мікроміцети виділяють ферменти у складі потужних мультиензимних комплексів (разом із целюлазами, ксиланазами та пектиназами).

Автори [40] характеризують грибні мультиензимні комплекси целюлаз, ксиланаз та глюканаз, які ефективно руйнують полісахариди, як допоміжні ферментні препарати.

Пирог Т.П. [38] розглядає склад мультиензимних комплексів мікроміцетів та їхнє застосування для підвищення поживності кормів тварин шляхом деградації клітинних оболонок зерна.

- *Trichoderma reesei*: світовий еталон. Продукує високоактивні екзо- та ендо- β -глюканази, стійкі до низьких значень pH (4.0–5.5). Ідеально підходить для гідролізу клітинних стінок зерна та солоду.
- *Aspergillus niger* / *Aspergillus oryzae*: Популярні GRAS-продуценти. Їхні β -глюканази мають високу термостабільність (до 60°C) і часто використовуються у пивоварінні для зниження в'язкості сусла, що фільтрується.
- *Penicillium emersonii* (*Talaromyces emersonii*): Відомий своєю екстремальною термотолерантністю. Ферменти цього гриба здатні ефективно розщеплювати β -глюкани за температури 65–70°C.

Літературні дані свідчать про те, що найчастіше для виробництва використовують грибні культури. Найбільшу продукуючу здатність серед продуцентів мають різні види роду *Trichoderma*: *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*.

Вибір мікроскопічного гриба *Trichoderma reesei* як біологічного агента обґрунтовується його унікальною здатністю до **високого синтезу целюлолітичних ферментів** (целюлаз і геміцелюлаз) та комплексом видатних біотехнологічних характеристик. Головна перевага *Trichoderma reesei* — це не просто висока кількість білка, а синергетична дія його ферментних систем, спрямованих на розщеплення складних полісахаридів. Вибір *Trichoderma reesei* забезпечує високий вихід високоактивних ферментів, технологічну стабільність процесу ферментації та гарантовану токсикологічну безпеку кінцевого продукту [41, 42].

Вибраним біологічним агентом є *Trichoderma reesei* штам М-4, який застосовують на Ладизинському ферментному заводі «ENZIM». Штам є стійким до інфікування в умовах виробництва і за умови додавання до ПС індуктору – МКЦ активно продукує комплекс грибних карбогидраз, що включає ендо-1,3- β -глюканазу, - ендо-1,4- β -глюканазу. Ферментний препарат

має суттєвий рівень додаткових активностей до розщеплення геміцелюлоз, ксиланів і целюлози [43, 44].

2.2.2. Характеристика біологічного агента

Гриби роду *Trichoderma* мають дуже характерну мікроскопічну структуру, яку легко впізнати за характерним пірамідальним розгалуженням. Гіфи гриба добре розвинені, септовані. Кінцеві клітини на конідієносцях утворюють спори. Вони мають грушоподібну форму і розташовані групами або поодиноці, розширюючись посередині й звужуючись до верхівки (рис.2.2).

Представники роду *Trichoderma* мають вегетативне одноклітинне тіло з перегородками, які визначають репродуктивні органи, або ж багатоклітинне, розгалужене, з перфорованими перегородками. Кріплення до субстрату здійснюється за допомогою спеціальних присосок.

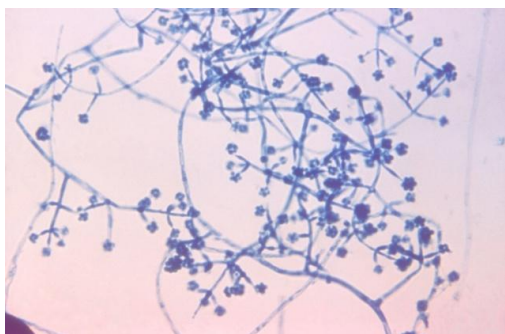


Рис.2.2 Мікроскопічна структура *Trichoderma*

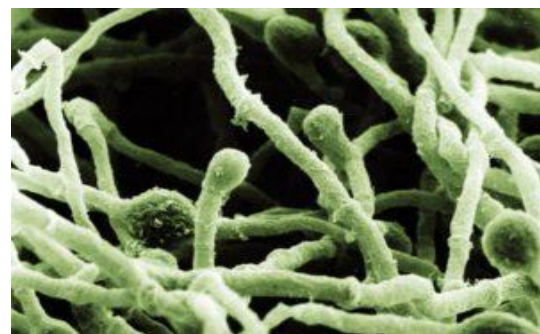


Рис.2.3 Деталь ниткоподібних гіфів *Trichoderma*

Види *Trichoderma* виробляють широкий спектр пігментів від яскраво-зеленувато-жовтого до червонуватого кольору, хоча деякі - безбарвні. Подібним чином, конідіальна пігментація варіюється від безбарвного до різних зелених відтінків, а іноді також сірого або коричневого. Крім пігментації, ідентифікація видів у роді утруднена через вузький діапазон варіацій спрощеної морфології *Trichoderma*. *Trichoderma* характеризуються швидким ростом, переважно яскравозеленими конідіями та багаторазово розгалуженою конідієформною структурою. *Trichoderma* є повсюдними колонізаторами целюлозних матеріалів і тому їх часто можна зустріти скрізь, де є гнилий

рослинний матеріал, а також у ризосфері рослин, де вони можуть викликати системну стійкість проти патогенів.

Наприклад, зустріти гриби часто можна на корі, деревині, на сухому листі, стеблах, а також на насінні різних трав, кущів та дерев. Гриби легко виділяються з ґрунту на підкисленому сусло-агарі. Через 2-3 дні інкубації при 23-25° С на поверхні агару з'являється білий, а потім уже зеленкуватий рихлий наліт, що утворився міцелієм і скупченням конідієносків. У грибів *Trichoderma* безбарвні гіфи міцелію з перегородками, часто розгалужені, гладкі. Хламідіоспори шароподібні або еліпсоподібні. Конідієноски дуже розгалужені, компактно скупчені у подушечках, хаотично згуртовані або поодинокі на повітряних гіфах. Конідієноски мають систему типу ялини, тобто, від основної осі конідієноскя під великим кутом відходять розгалуження по 2-3 або по одному, а від них вже менші галузіння другого порядку. І всі вони до верху вкорочені. Верхівка закінчується фіолідами – кеглеподібними або пляшкоподібними гілками. Конідії утворюються на фіалідах по одній, формуючи шароподібну або більш продовгувату голівку; безбарвні, жовті, темно-зелені (рис.2.3) [45, 46, 47].

Розвиток на твердих поживних середовищах (Чапека, СА) має характерну динаміку, за якою здійснюють первинну ідентифікацію. Ріст швидкий. За температури 25°–28° міцелій повністю заповнює чашку Петрі за 3–4 доби. За 1-2 доби утворюється пухкий, рідкий, повітряний міцелій білого або напівпрозорого кольору (рис. 2.4).

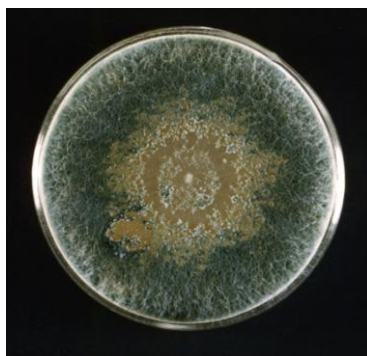


Рис.2.4 Міцелій *Trichoderma* на чашці Петрі

Поверхня колонії спочатку або гладка або павутинна, згодом стає більш щільною, пластівчастою через утворення конідієносців. Спочатку вони мають білий колір, який у міру дозрівання спор змінюється на світло-зелений, жовто-зелений, темно-зелений колір. Більшість штамів під час культивування виділяють характерний сильний земляний або грибний запах. Гриб має збалансовану систему позаклітинних гідролаз, здатних повністю руйнувати складні полісахариди рослинних клітинних оболонок. Ацидофільна культура. Оптимальне значення рН для росту та активного виділення ферментів лежить у слабнокислому діапазоні: рН 4,5–5,5. Здатність активно розвиватися за низьких значень рН забезпечує додатковий захист промислової ферментації від бактеріального інфікування. За типом дихання облігатний аероб. Культивування потребує інтенсивної аерації (подачі стерильного повітря) та перемішування середовища для підтримки високого рівня розчиненого кисню.

Важлива біохімічна ознака *Trichoderma reesei* штаму М-4: біосинтез целюлазного комплексу (табл.2.2).

Таблиця 2.2 - Ферментні комплекси *Trichoderma reesei* штаму М-4

Ферментна група	Основні представники	Субстрат дії
целюлази	Ендо-1,4- β -глюканази, целобіогідролази	Кристалічна та аморфна целюлоза, мікрокристалічна целюлоза (МКЦ), целобіоза
геміцелюлази	Ендо-1,4- β -ксиланази, β -ксилозидази, β -арабінофураносидази	Ксилани, арабіноксилани зернових культур
β -глюканази	Ендо-1,3- β -глюканази, ендо-1,6- β -глюканази	Глюкани клітинних стінок дріжджів та ячменю

2.2.3. Розмноження мікроміцетів роду *Trichoderma*

Мікроміцети мають три способи розмноження: вегетативний, статевий і безстатевий [48, 49].

Вегетативне розмноження мікроміцетів роду *Trichoderma* відбувається шляхом фрагментації міцелію, брунькування клітин, а також утворення спеціалізованих клітин спокою — хламідоспор, що представляють собою клітини гіфів з товстою оболонкою. Зазвичай ці спори мають певне забарвлення та містять запасні речовини. Цей процес є частиною їхнього життєвого циклу, спрямованого на виживання в несприятливих умовах та швидке захоплення поживного субстрату [50].

Статеве розмноження мікроміцетів роду *Trichoderma* — це унікальний та рідкісний у повсякденній практиці процес. У природних умовах статевий процес *Trichoderma* активується восени або за умов високої вологості й нестачі поживних речовин. В результаті статевого процесу із зиготи утворюється аскогенні гіфи, на яких утворюються, так звані, сумки. Сумка являє собою спеціалізовану клітину, що формується у результаті статевого процесу і є його кінцевим етапом після плазмогамії, каріогамії та мейозу. В сумці утворюються спори, за допомогою яких відбувається подальше розмноження. Функцію антеридію виконуються спермації – малі нерухливі клітини, які потрапляють на аскогін з повітрям, дощем, за допомогою комах; або клітини вегетативних гіф – конідії [51].

Безстатеве розмноження відбувається з допомогою конідій – екзогенних спор різної структури і способом утворення. У *Trichoderma* цей процес відбувається за допомогою зовнішнього конідіального спороношення. Конідії формуються на спеціальних структурах, що називаються конідієносцями. На поверхні конідієносця виростають стеригми і фіаліди, які містять конідії. Утворення конідій починається з проростання кінця конідієносця, що призводить до утворення невеликого випирання - пагорба.

Потім пагорб відділяється поперечними перегородками, що формуються за рахунок цитоплазматичного випирання. Після дозрівання конідія відпадає і стає початком нової особини [52, 53].

2.3. Особливості поживних середовищ і умов культивування для синтезу β -глюканази

Для забезпечення високого рівня біосинтезу β -глюканаз мікроміцетами (зокрема, штамів роду *Trichoderma*) підбір складу поживного середовища та параметрів культивування має дуже велике значення. β -глюканази є переважно індукцибельними ензимами. Їхній синтез жорстко контролюється механізмами індукції та вуглецевої (катаболітної) репресії. Тому правильний баланс джерел вуглецю, азоту та мікроелементів є вирішальним.

Сигналом для запуску транскрипції генів целюлаз виступає наявність у середовищі МКЦ, лактози або целобіози. Водночас у диких штамів процес пригнічується надлишком глюкози. Гриб легко засвоює вуглеводи — від моносахаридів (глюкоза, галактоза, ксилоза) до складних полімерів (целюлоза, геміцелюлоза, пектин, крохмаль). Добре засвоює як мінеральний азот (солі амонію, нітрати), так і органічний (пептон, амінокислоти, дріжджовий автолізат). Амонійний азот є більш переважним для швидкого нарощування біомаси. Все це робить *Trichoderma reesei* штам М-4 ідеальним об'єктом для стабільного промислового одержання мультиензимних кормових препаратів. Дослідниками [54] було проведено безліч експериментів щодо визначення впливу різних джерел вуглецю на ріст грибів роду *Trichoderma*. Як головне джерело вуглецю доцільно використовувати складні полісахариди або відходи переробки рослинної сировини, що містять β -глюкани. Найкращими субстратами автори вважають ячмінне борошно, висівки (пшеничні або житні), буряковий жом. На Ладизинському ферментному заводі як дешевий вуглецевий субстрат використовують буряковий жом, пшеничні висівки або кукурудзяний екстракт.

На основі вищезазначених факторів, оптимізованим середовищем для синтезу β -глюканази продуцентом *Trichoderma reesei* штам М-4 нами запропоновано модифіковане середовище, до складу якого входять мікрокристалічна целюлоза та лактоза як комплексні індуктори біосинтезу, а також соєве і вівсяне борошно як збалансовані джерела органічного живлення.

Вибір такого поживного середовища дозволяє синхронізувати швидкість росту продуцента зі швидкістю індукції ферменту, що забезпечує максимальну ферментативну активність препарату за мінімальних витрат на компоненти середовища.

Ефективність підбраного середовища реалізується лише за контролю параметрів культивування.

2.4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

Для розробки високоефективного біотехнологічного процесу промислового отримання ферментного препарату β -глюканази необхідно враховувати біологічні особливості мікроорганізму-продуцента та вимоги до кінцевої чистоти і форми продукту (харчова, кормова чи технічна).

Для більшості біотехнологічних виробництв у тому числі й для β -глюканази типовими є більшість виробничих стадій.

Для реалізації розробленої технології виробництва ферментного препарату β -глюканази було обрано метод глибинного періодичного культивування (ферментації) з інтенсивним перемішуванням та аерацією.

Різниця прослідковується на останніх стадіях – очищенні ферментного препарату. Вибір способів очищення продиктований галуззю застосування ферменту. Не менш важливими є її економічні показники. На стадіях очищення важливо максимально зберегти активність ферменту, що також впливає на ефективність роботи підприємства. Застосування сучасних технологій ферментації та очищення дозволяє отримувати β -глюканазу з високою специфічністю, стабільністю і активністю, що є важливим для її подальшого застосування у харчовій, фармацевтичній та біотехнологічній промисловості.

Для виділення та очищення нашого ферментного препарату застосовуємо фільтрування на сучасній ультрафільтраційній установці, що дозволить зберегти активність ферменту. Якщо обрати осадження амонію сульфатом, після нього обов'язково потрібен тривалий і дорогий діаліз, щоб очистити фермент від самої солі; при осадженні ферменту з КР за допомогою спирту значно втрачається його активність. Ультрафільтрація не потребує жодних сторонніх хімічних речовин, тому на виході ми маємо чистий концентрат, готовий до сушіння. Це важливо, якщо β -глюканаза призначена для харчової промисловості.

Препарат пропонуємо висушувати на розпилювальній сушарці.

Ладизинський завод - виробник «ENZIM» отримує препарат БЕТАЛАД у рідкому стані, що скорочує термін зберігання продукції, потребує підвищені вимоги до температури зберігання та освітлення готового рідкого препарату.

Ми пропонуємо порошкову форму (стандартний розпилювальний сухий порошок). У сухому порошку вологість становить до 5%, що практично зупиняє процеси денатурації білка та автолізу ферментів. Відсутність вільної води робить середовище непридатним для розвитку бактерій чи плісняви. Порошкові ферменти без втрати активності зберігаються від 12 до 24 місяців. Сухий порошок значно легше переносить коливання температур під час перевезення, що знижує ризик псування цілої партії товару при логістиці. Його легко зважувати та порціонувати на автоматизованих лініях та можна змішувати з іншими сухими компонентами.

Оптимізація кожного етапу виробництва сприяє зниженню виробничих витрат і підвищенню якості кінцевого продукту, що робить технологію конкурентоспроможною та перспективною для масштабного промислового застосування.

Новизною роботи є розробка технології виробництва ферментного препарату β -глюканази з використанням соєвого та вівсяного борошна у певних співвідношеннях та веденні технологічного процесу з корегуванням

температури, рН у процесі вирощування, застосуванням нового обладнання для концентрування ферменту, що забезпечує максимальне збереження його активності.

Данна технологія відповідає принципам екологічної безпеки, сприяє виробництву конкурентоспроможної продукції, яка може бути експортована і підтримувати економіку України.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ β - глюканаз

3.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

β -глюканаз – це фермент, який каталізує розщеплення субстрату β -глюканів по місцю 1,3 і 1,4-глікозидних зв'язків з утворенням низьков'язких ізомальтози і мальтотріози. Фермент має значний рівень побічних активностей щодо розщеплення геміцелюлози, ксиланів та целюлози.

Зовнішній вигляд: порошок, гранули та концентрат, який фасується в каністри об'ємом 5, 10, 20 або 25 літрів (рис.3.1).



Рис. 3.1. Товарні форми β -глюканаз

β -глюканаз ефективно використовується в технологічних процесах різних галузей, в тому числі, виробництво спирту і пива, целюлозно-паперова та текстильна промисловість.

Особливості застосування:

- Дозування залежить від сировини, яка переробляється і технологічного процесу. Рекомендоване дозування 0,1 - 0,3 л/т сировини, як початковий діапазон для подальшої оптимізації.
- Температурний діапазон роботи препарату: 30 °С - 70 °С.
- Оптимальний діапазон дії рН 4,5-5,5.

Умови зберігання:

Зберігати при t° від + 2 °С до + 15 °С в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці

Табл. 3.1- Показники активності для комерційних препаратів

Форма препарату	Типова активність (од/г або од/мл)	Призначення
Кормові добавки (стандартні)	1000 – 10000 од/г	Збагачення комбікормів для птиці та свиней
Висококонцентровані порошки	50000 – 200000 од/г і більше	Для преміксів та технологічних розведень
Рідкі концентрати (для пивоваріння/спирту)	10000 – 80000 од/мл	Зниження в'язкості суслу, покращення фільтрації

Для отримання нашого ферментного препарату використовуємо продуцент *Trichoderma reesei* штам 4. Використовуємо глибинний метод культивування, як більш економічний з технологічної точки зору. Для виділення ферментів використовуємо центрифугування. Фермент очищуємо за допомогою рамних картонних фільтрів та ультрафільтрації з застосуванням керамічних фільтрів. Отримуємо високо очищений стабілізований ферментний препарат з індексом Г20_x у висушеному стані з прогнозованою β -глюканазою активністю до 5000 од./г.

Вихід біомаси з 1 м³ культуральної рідини становить до 20-35 кг при вмісті сухих речовин близько 20–25 %. Бета – глюканаза Г20_x - розчинний порошок або концентрат світло-жовтого кольору. Термін придатності: 12 місяців, при температурі зберігання від -25°C до + 20°C в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці. Препарат фасують по 0,5–10 кг в поліетиленові або паперові мішки, концентрат – в канистри об'ємом 5, 10 або 20 л.

Кінцевий продукт, особливо якщо він призначений для харчової чи кормової промисловості, повинен суворо відповідати стандартам безпеки:

- препарат не повинен містити живих клітин продуцента (штамів-продуцентів) та антибіотиків, які могли використовуватися під час біосинтезу,
- вміст свинцю, миш'яку, кадмію та ртуті не повинен перевищувати суворо встановлені санітарні норми,

- мікробіологічні показники

Активність ферменту визначають за міждержавним стандартом «Методы определения ферментативной активности эндо-глюканазы»
Enzyme preparations. Methods of endo - glucanase ferment activity detection.»

3.2. Особливості біосинтезу глюканаз

Біосинтез глюканаз - це складний процес. Його ефективність залежить від генетичних властивостей штамів-продуцентів, складу поживного середовища та умов культивування.

У мікроскопічних грибів (наприклад, *Trichoderma reesei*) та бактерій процес утворення глюканаз відбувається за принципом (рис.3.2.). Цей процес супроводжується складним каскадом сигнальних шляхів, де ключову роль відіграє відсутність вільної глюкози та наявність індуктора, що запускає зчитування генів у ядрі.

[Складний субстрат: β -глюкан]

|

| ◀— [Слідові (базові) ферменти]

▼

[Ди- та олігосахариди]

|

▼ (Транспорт всередину клітини)

| КЛІТИНА-ПРОДУЦЕНТ |

| |

| [Низький рівень глюкози] —▶ Активація факторів транскрипції |

| |

| ▼ |

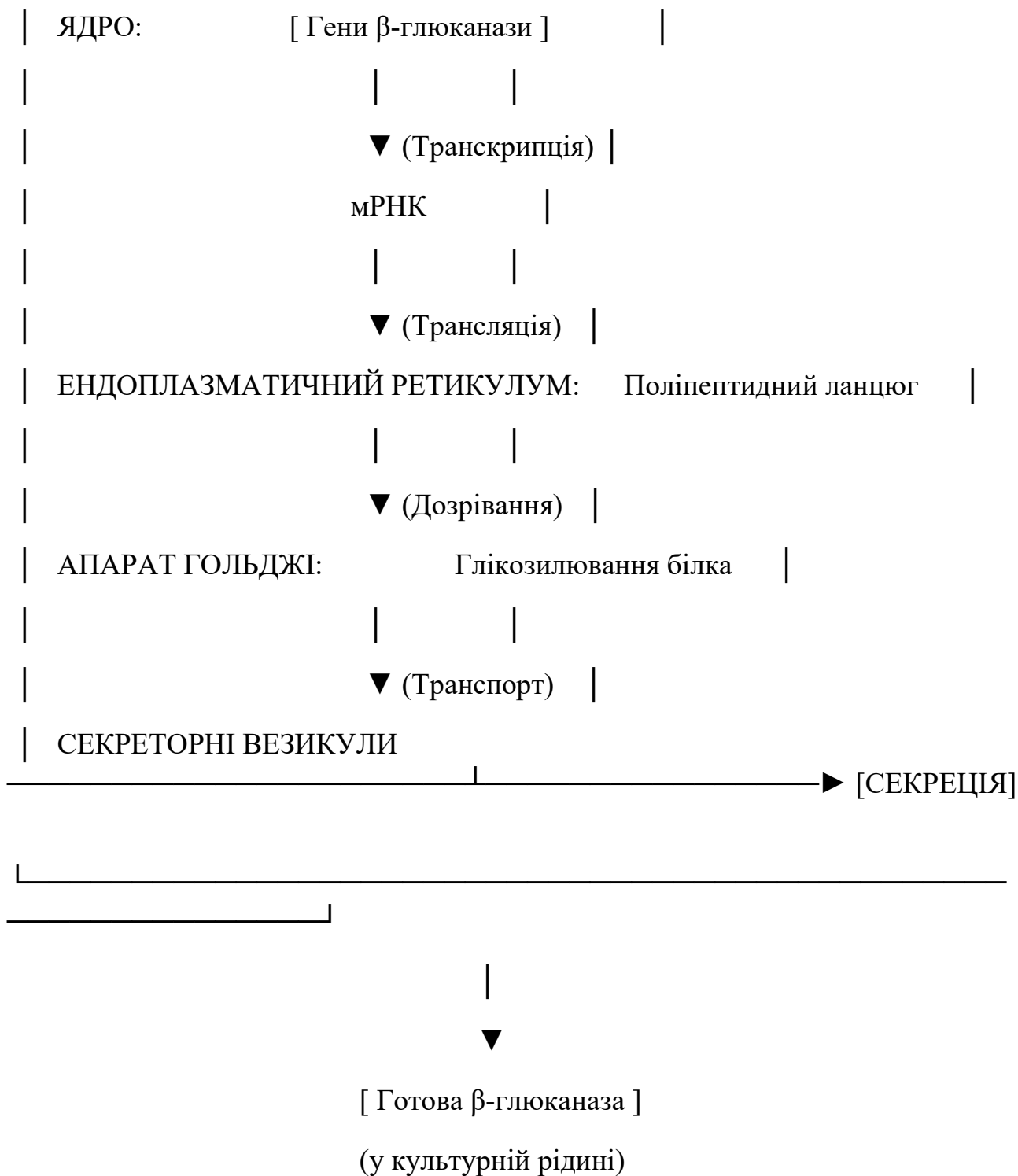


Рис. 3.2. Молекулярна схема біосинтезу та секреції β -глюканаз

1. Транскрипція в ядрі

- Ген *bgl1* (або *egl1*, *cel*, в залежності від організму) локалізується на ДНК.
- Активується транскрипційними факторами, наприклад:

- *Xyr1*, *Ace2*, *Crel* (активують або пригнічують експресію залежно від присутності індукторів або репресорів).
- Відбувається транскрипція → утворення первинної пре-мРНК.
- Процесинг пре-мРНК:
 - Сплайсинг (вилучення інтронів),
 - Кепування 5'-кінця,
 - Поліаденилювання 3'-кінця.
- Утворюється зріла мРНК β -глюканази.

2. Трансляція в цитоплазмі / на мембрані ЕПР

- мРНК транспортується з ядра в цитоплазму.
- Рибосоми прикріплюються до шорсткого ендоплазматичного ретикулу (ЕР).
- Розпочинається трансляція поліпептиду:
 - Якщо є сигнальний пептид, поліпептид потрапляє до просвіту ЕПР.
- Утворюється пре- β -глюканаза (неактивна форма).

3. Посттрансляційна модифікація

Відбувається у ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі:

- Фолдинг за допомогою шаперонів (наприклад, BiP, PDI).
- Глікозилювання:
 - N-зв'язане глікозилювання у ЕПР,
 - O-зв'язане глікозилювання у Гольджі.
- Формування дисульфідних зв'язків.
- Відщеплення сигнального пептиду → утворення активної форми.

4. Транспорт та секреція

- Фермент упаковується в везикули.
- Через апарат Гольджі транспортується до мембрани.
- Виводиться з клітини шляхом екзоцитозу.

Таблиця 3.2 - Супровідні компоненти

Стадія	Компоненти
Транскрипція	РНК-полімераза II, транскрипційні фактори (Xyr1, Ace2)
Трансляція	Рибосоми, tРНК, АТФ, GTP
Фолдинг	Шаперони: BiP, calnexin
Глікозилювання	Доліхолфосфат, UDP-глюкоза
Транспорт	СОРІІ везикули, SNARE-білки
Екзоцитоз	Апарат Гольджі, везикули секреції

3.3. Біосинтез глюканаз. Основні фактори і параметри що впливають на процес

3.3.1 Поживні середовища для культивування продуцентів глюканаз

Джерела вуглецю. Одним з основних елементів, які впливають на ріст і розвиток грибів, є вуглець. Вуглець є одночасно основою для побудови біомаси та сигналом для клітини, які запускають або блокують синтез екзоферментів. Дисахариди та олігосахариди забезпечують збалансований, помірний ріст міцелію і є специфічними хімічними сигналами для запуску потужної експресії ферментних систем. Ці джерела вуглецю характеризуються миттєвим транспортом через цитоплазматичну мембрану (шляхом полегшеної дифузії) і швидким залученням у шлях (гліколіз). D-глюкоза забезпечує найвищу питому швидкість росту та економічний коефіцієнт виходу біомаси досягає максимуму (0.45-0.50 г біомаси / г субстрату). Клітини мають високий енергетичний заряд. У глибинній культурі глюкоза стимулює утворення довгих, сильно розгалужених гіфів з тонкою клітинною стінкою. При надлишку глюкози міцелій схильний до утворення конгломератів, що може погіршувати масообмін кисню в центрі гранули. D-ксилоза метаболізується через пентозофосфатний

шлях (після відновлення ксилозоредуктазою до ксиліту). Має унікальний двофазний ефект. У високих концентраціях (>10 г/л) діє як катаболітний репресор через той самий білок CRE1. У низьких концентраціях (<2 г/л) є потужним індуктором синтезу ксиланаз та енд- β -1,4-глюканаз, оскільки активує головний транскрипційний фактор XYR1. Лактоза не викликає швидкого росту, тому що її транспорт у клітину лімітований. Проте вона забезпечує тривалу, стабільну фазу без накопичення токсичних кислих метаболітів. Міцелій стає більш коротким, потовщеним, що є морфологічною ознакою готовності до активної секреції білка.

Джерела азоту. Важливим елементом є азот. Оптимальним є поєднання амонійного азоту та органічного азоту (кукурудзяного екстракту, дріжджового автолізу або пептону). Амонійні солі швидко засвоюються мікроорганізмом на початкових етапах росту для формування біомаси. Органічні джерела (наприклад, кукурудзяний екстракт) розщеплюються повільніше, забезпечуючи постійний приплив амінокислот та вітамінів (особливо групи B) на стадії активного виділення ензиму, а також виступають буфером середовища [55].

Мінеральний склад та мікроелементи. Фосфор необхідний для синтезу АТФ та нуклеїнових кислот. Іони магнію виступають кофакторами багатьох внутрішньоклітинних ферментів енергетичного обміну.

Іони металів. Стабілізують третинну структуру ферментів та активують метаболічні шляхи продуцента [56].

Гриби роду *Trichoderma* є ацидофільними мікроорганізмами. Вони мають високу толерантність до низьких значень рН, що дає їм еволюційну перевагу та знижує ризик бактеріальної контамінації в промислових ферментерах. У промисловому біосинтезі бета-глюканаз використовують стратегію ступінчастого регулювання рН, оскільки оптимуми для росту та виділення ферментів не збігаються: Фаза інтенсивного росту міцелію: Оптимальне значення рН = 4,5-5,5. За цих умов транспортні системи клітини (пермеази) функціонують найефективніше, забезпечуючи високу питому швидкість росту.

Фаза біосинтезу та секреції ферменту (Ідіофаза): Оптимум зміщується в більш кислу зону - $pH = 3,5-4,0$. Температура визначає швидкість усіх біохімічних реакцій у клітині. Оптимальні діапазони для росту: $28-30^{\circ}C$. У цьому діапазоні спостерігається збалансований анаболізм, лаг-фаза мінімальна, а тепловиділення культури (метаболічне тепло) компенсується сорочкою охолодження ферментера. Зниження температури на кілька градусів у другій фазі культивування є класичним прийомом у промисловій біотехнології мікроміцетів. Гриби роду *Trichoderma* є суворими (облігатними) аеробами. Кисень є кінцевим акцептором електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій. Енергетична ефективність росту на глюкозі в аеробних умовах (шляхом окисного фосфорилування) становить 36-38 молекул АТФ на 1 молекулу глюкози, тоді як в анаеробіозі цей шлях блокується, що призводить до загибелі культури. У промислових ферментерах об'ємом 100 м^3 підтримання оптимального рівня забезпечується взаємодією двох факторів: питомої подачі повітря (аерації) та перемішування.

У промисловій біотехнології (наприклад, при виробництві біопрепаратів або для завершення певних циклів ферментації) максимізація конідієутворення досягається через спрямовану зміну фізико-хімічних факторів. Для переведення культури *Trichoderma* з фази максимального накопичення біомаси у фазу тотального споруутворення біотехнолог має застосувати комплексний метод.

Таблиця 3.3 – Зміна фізико-хімічних факторів

Крок у регламенті	Дія	Очікуваний біологічний ефект
1. Трофічний блок	Припинення подачі джерела вуглецю та азоту (виснаження середовища).	Зняття катаболітної репресії з генів конідієгенезу.
2. Світловий імпульс	Опромінення культури синім світлом або регулярна зміна циклів світло/темрява.	Активация фоторецепторного комплексу BLR1/BLR2 - запуск транскрипції генів <i>con</i> .
3.	Збільшення подачі повітря,	Забезпечення енергією процесу

Оксигенація	забезпечення контакту з повітряним середовищем.	диференціації клітин.
4. Термічний зсув	Зниження температури у ферментаторі на 3–4° С порівняно з ростою фазою.	Перемикання метаболізму з конструктивного на репродуктивний.

Така послідовність дій дозволяє отримати високий титр життєздатних, морфологічно однорідних конідій, стійких до подальших процесів стабілізації (наприклад, висушування або грануляції за технологічними схемами (Л. В. Капрельянц Обмін речовин).

3.3.2 Отримання препаратів з глибинних аеробних культур

В якості посівного матеріалу можна використовувати поверхневу культуру продуцентів, споровий матеріал або молоду глибинну культуру. В Україні в якості посівного матеріалу найчастіше використовують заспоровану поверхневу культуру або ту саму культуру, але активовану шляхом підрощування спор глибинним способом. Сутність такої обробки полягає в наступному: синхронізації та прискоренні переходу спорового матеріалу у фізіологічно активний стан (вегетативну форму) ще до його внесення в основний промисловий ферментер.

Процес отримання β -глюканаз шляхом глибинного аеробного культивування є основним промисловим методом у сучасній біотехнології. Він дозволяє стандартизувати умови, автоматизувати процес та отримувати високі виходи ферменту за відносно короткий проміжок часу.

Для досягнення максимального виходу β -глюканази у ферментері необхідно підтримувати параметри у строго визначених межах. Продуценти глюканаз, особливо гриби *Trichoderma reesei*, є строгими аеробами. Кисень необхідний для дихання та енергетичного обміну (генерації АТФ), без якого синтез білка зупиняється. У промислових умовах рівень розчиненого кисню підтримують на рівні 20–40% від насичення, регулюючи подачу стерильного повітря та швидкість мішалки.

На синтез ферментів також помітно впливає температура вирощування.

Температурний режим при культивуванні грибів роду *Trichoderma* є одним із головних інструментів керування балансом між конструктивним обміном (ростом) та ідіофазою (виділенням цільового ферменту). Неправильний розподіл температурних навантажень наприкінці циклу ферментації є основною причиною передчасного автолізу міцелію — самозруйнування клітин під дією власних внутрішньоклітинних протеаз та нуклеаз, що призводить до повної деградації накопиченої бета-глюканази.

Температурний оптимум зростання (фаза накопичення біомаси). Оптимум зростання: 28-30° С (для більшості промислових штамів *Trichoderma reesei* та *T. viride*). Фізіологічне обґрунтування: При цій температурі досягається максимальна питома швидкість росту. Активно працюють ферменти реплікації ДНК, синтезу хітину та компонентів клітинної стінки. Гіфи ростуть збалансовано, формуючи міцну, молоду та життєздатну біомасу. *Особливості температурного режиму на стадії після росту (фаза секреції ферментів).* Коли культура досягає максимального об'єму біомаси, а легкозасвоювані джерела вуглецю вичерпуються, процес переходить в ідіофазу — активний синтез і позахресний фолдинг бета-глюканаз. На цій стадії підходи до термостатування кардинально змінюються. Зниження температури до 25-26° С. Уповільнення конструктивного метаболізму досягається штучним зниженням температури в апараті на 3-4° С порівняно з ростовим оптимумом до рівня 25-26° С. *Температурна стратегія запобігання автолізу міцелію.* Автоліз починається тоді, коли клітина відчуває глибоке голодування та енергетичний дефіцит (падіння пулу АТФ), що змушує її розщеплювати власні структури для підтримки базових функцій. За рахунок температури цей процес можна суттєво затримати.

3.3.3. Отримання посівного матеріалу у виробничих інокуляторах

Від якості, фізіологічного стану та кількості біомаси на цьому етапі безпосередньо залежить вихід цільового ферменту в головному ферментері. Оскільки більшість промислових продуцентів є аеробами, головне завдання в

інокуляторі — забезпечити інтенсивне насичення середовища киснем та оптимальне перемішування без пошкодження міцелію. Процес отримання посівного матеріалу завжди є багатоступеневим, оскільки об'єм інокуляту для наступного апарату має становити біля 10% від об'єму середовища в ньому. Процес в інокуляторі триває доти, доки культура не досягне кінця експоненціальної фази росту. У цей момент клітини найбільш життєздатні та активні. Коли посівний матеріал готовий, його транспортують за допомогою надлишкового тиску стерильного повітря через спеціальний інокуляційний трубопровід у головний виробничий ферментер, де міститься підготовлене та охолоджене середовище для біосинтезу β -глюканаз.

3.3.4. Ферментація

Центральною являється стадія ферментації, під час якої відбувається утворення цільового продукту за рахунок перетворення компонентів поживного середовища спочатку в біомасу, а потім, якщо це необхідно, в цільовий метаболіт. На ферментацію впливають фізико-хімічні фактори та склад середовища. Температура впливає на швидкість ферментативних реакцій у середині клітини, ріст біомаси. Рівень рН впливає на те, як клітина пропускає речовини, структуру її білків та транспорт речовин.

3.3.5. Виділення ферментів

Після завершення процесу ферментації у культурній рідині накопичується велика кількість β -глюканаз. Тому завданням етапу виділення є відокремлення біомаси, концентрування та отримання стабільної товарної форми (рідкої або сухої). Для відокремлення біомаси необхідно повністю видалити клітини продуцента (міцелій грибів або бактерії) з культурної рідини, залишивши чистий розчин ферменту. Фільтрат або надходить на осадження органічними розчинниками, або попередньо концентрується методом ультрафільтрації або вакуум-випарюванням, коригується рН ферментного розчину, і проводиться розчинниками або нейтральними солями. Концентрування ферментних розчинів методом ультрафільтрації проходить зазвичай успішно. Втрати

активності не перевищує 6-8%. Найбільша швидкість процесу за ступенем концентрування 10 встановлена при надмірному тиску 0,4 МПа.

Відомо, що процес осадження ферментів з культуральної рідини і її концентратів залежить від рН середовища, природи і концентрації розчинника. Зазвичай використовується етиловий спирт.

Таблиця 3.4 - Порівняльний аналіз недоліків та переваг методів

Критерій порівняння	Недоліки класичного методу (Осадження етиловим спиртом)	Переваги пропонованого методу
Ризик денатурації ферменту	Високий. Спирт діє як дегідратуючий агент. При щонайменшому локальному перегріві або порушенні швидкості подачі спирту відбувається необоротна денатурація бета-глюканази та втрата її нативної активності.	Відсутній. Процес ультрафільтрації є суто фізичним розділенням на молекулярному рівні, що перебігає без фазових переходів та хімічних реагентів при низьких температурах (15-18° С)
Економічні витрати та витрата реагентів	Надзвичайно високі. Для повного осадження білка необхідно вносити від 3 до 4 об'ємів охолодженого спирту на 1 об'єм культуральної рідини. Це вимагає закупівлі, зберігання та регенерації колосальних об'ємів спирту.	Мінімальні. Витратними матеріалами є лише мембранні модулі (які служать кілька років) та електроенергія для роботи насосів високого тиску.
Пожежо- та вибухонебезпека	Критична. Робота з великими об'ємами ЛЗР (легкозаймистих рідин) вимагає проектування цеху за вищими категоріями вибухонебезпеки (Б-Ia, Б-Iб), встановлення дорогого іскрозахищеного обладнання та систем пожежогасіння.	Повна безпека. Процес є абсолютно пожежо- та вибухобезпечним, оскільки в технологічному потоці використовуються лише водні розчини та концентрати.
Екологічне навантаження та	Високе. Неминучі втрати спирту при випаровуванні та	Екологічно чисте виробництво. Пермеат

утилізація	сушці осадів забруднюють атмосферу. Спиртові барди вимагають складних та енерговитратних систем рекуперації (дистиляції).	(фільтрат), що пройшов крізь мембрану, містить лише воду та низькомолекулярні солі й може повторно використовуватися для миття обладнання або оборотного водопостачання.
Товарна форма продукту	Незадовільна. Після спиртового осадження та висушування утворюється дрібнодисперсний аморфний порошок. Він сильно пилить, що викликає алергічні реакції та професійні захворювання (асму) у персоналу заводу та кінцевих споживачів.	Ідеальна. Пропонована стадія забезпечує стабільність ферменту при зберіганні

Ферментні препарати можна отримувати і шляхом висолювання сульфатом амонію.

Осадження білків нейтральними солями, або висолювання, є ще одним класичним методом лабораторного виділення ферментів. Найчастіше для цього використовують сульфат амонію, оскільки він має високу розчинність у воді та відносно м'яко діє на структуру білка. Проте при переході від лабораторної практики до промислового масштабу (наприклад, при переробці великих об'ємів культуральної рідини *Trichoderma* у ферментерах об'ємом 100 м³) метод висолювання сульфатом амонію виявляє низку критичних технологічних та економічних недоліків. Нижче наведено детальну характеристику цих недоліків порівняно з пропонованим методом (ультрафільтрацією): 1. *Необхідність тривалої та дорогої стадії знесолення (Діалізу)*. Це найголовніший мінус методу. Після висолювання отриманий осад ферменту містить величезну кількість солі. Залишковий сульфат амонію робить препарат непридатним для використання у харчовій чи кормовій промисловості (через токсичність та гіркий смак). 2. *Колосальна витрата солі та складність її*

дозування. Для повного осадження бета-глюканаз зазвичай потрібен високий ступінь насичення середовища сульфатом амонію (близько 60–80%). 3. *Корозійна агресивність середовища.* Сульфат амонію у високих концентраціях є надзвичайно агресивною хімічною речовиною.

Після запропонованого нами метода ультрафільтрації відбувається сушіння ферментного препарату. Відомо, що висока температура носія сушіння негативно впливає на активність ферментного препарату. Для зниження втрат рекомендується перед сушінням розпилюванням з наповнювачем стабілізувати розчин сірчанокислим алюмінієм, що дозволяє при режимі сушки з температурою повітря 140-160°C на вході і 70-80°C на виході отримувати препарати з втратою активності, не перевищує 5-10%.

Ступінь очищення ферментів визначається областю їх застосування. Так для агропромислового комплексу рекомендовані препарати, отримані розпилювальною сушаркою з концентратів культуральної рідини або без висушування з додаванням стабілізаторів. В харчовій промисловості використовують препарати ферментів глюканаз, осадженням етиловим спиртом або іншими розчинниками, для медицини – препарати високого ступеня очищення, одержані з використанням хроматографії, електрофорезу тощо.

3.4. Отримання товарних форм

Отримання товарних форм β -глюканази — це завершальний етап біотехнологічного виробництва, який перетворює очищений ферментний препарат на стабільний продукт, готовий до транспортування, зберігання та використання.

Процес отримання товарних форм поділяють на два основних напрямки: виробництво рідких та сухих ферментних препаратів.

1. Отримання рідких товарних форм

Рідкі форми є найекономічнішими у виробництві, оскільки вони не потребують енерговитратних процесів сушіння. Проте вони більш схильні до мікробного псування та втрати активності.

2. Отримання сухих товарних форм

Сухі препарати стабільніші, мають тривалий термін придатності (до 2 років) і зручніші для транспортування, проте їх виробництво дорожче.

- **порошкоподібні форми** - це найпоширеніший метод у промисловості,
- **гранульовані форми** (пил від звичайних порошків ферментів є сильним алергеном для персоналу заводів (обличчя, дихальні шляхи), тому для багатьох галузей (особливо виробництва комбікормів) ферменти обов'язково гранулюють)

3. Мікрокапсулювання та захист (для тваринництва) - має витримувати жорсткі умови.

Оскільки біологічна активність ферменту в різних партіях після культивування може коливатися, фінальним кроком є *стандартизація* (табл. 3.5).: отриману суху або рідку форму аналізують у лабораторії на точну активність, продукт пакують у герметичну тару (мішки з поліетиленовим вкладишем або пластикові канистри).

Таблиця 3.5 - Основні показники якості β -глюканази

Показник	Норма / Характеристика
Фізичний стан	Порошкоподібна або рідка речовина
Колір	Від світло-жовтого до коричневого
Активність ферменту	50–10 000 ЄО/г (<i>Enzymatic Units/gram</i>)
Оптимальний рН дії	4.0–6.0 (залежно від джерела ферменту)
Оптимальна температура активності	40–65 °C

Стабільність	Стабільна при температурі до 50 °С, рН 4–7
Залишкова вологість (для порошку)	< 8%
Протеїновий вміст	60–80% (в екстрактах високої чистоти)
Наявність токсинів / ГМО	Не допускається (для продуктів харчування)
Мікробіологічна чистота	Відповідно до ДСТУ або ISO для ферментів

Вимоги до упаковки та зберігання

Упаковка:

- Мішки з ламінованого паперу або поліетилену (1–25 кг)
- Контейнери з темного пластику (для рідких форм)

Умови зберігання:

- Темне, сухе, добре провітрюване приміщення
- Температура: не вище +25 °С
- Захист від вологи, прямих сонячних променів та шкідників

Термін придатності:

- Порошок: до 24 місяців
- Рідина: 6–12 місяців залежно від стабілізатора

РОЗДІЛ 4. ПРОДУКТИВНИЙ РОЗРАХУНОК І МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ β-ГЛЮКАНАЗНОЇ ДІЇ

4.1 Продуктовий розрахунок виробництва ферментного препарату

β - глюканази Г20х потужністю 85 умов. тон на рік

1. Початкові дані для розрахунку матеріального балансу

Г _{ут} – потужність підприємства в умовних тоннах ферменту	Г _{ут} = 85
Ум. тон/рік	
Т _{рд} – кількість робочих днів у зміні	Т _{рд} = 308
А _{ст} – стандартна активність препарату, од/г	А _{ст} = 3500
А _{уо} – умовна активність препарату, од/г	А _{уо} = 5000
А _{кр} – активність культуральної рідини, од (мл)	А _{кр} = 10
Т _{цф} – час циклу роботи ферментера, год	Т _{цф} = 60
Т _{цп} – час циклу роботи посівного апарату, год	Т _{цп} = 15
Т _{ці} – час циклу роботи інокулятора, год	Т _{ці} = 15
К ₁ – коефіцієнт запасу, (1,1...1,5)	К ₁ = 1,5
К _з – коефіцієнт заповнення ферментера, частка барботажного (0,45...0,55), комбінованого (0,5...0,7)	К _з = 0,7
К _{па} – коефіцієнт заповнення посівного апарату, частка	К _{па} = 0,7
К _{ін} – коефіцієнт заповнення інокулятора, частка	К _{ін} = 0,55
К _{зб} – коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7...0,8)	К _{зб} = 0,8
Е _{св} – сумарні витрати активності при виділенні головного продукту, частка	Е _{св} = 0,275
Х _{вф} – засівна концентрація ферментерів, частка (0,05...0,1)	Х _{вф} = 0,1
Х _{пв} – засівна концентрація посівних апаратів, частка (0,02...0,1)	Х _{пв} = 0,1
Х _{ін} – засівна концентрація інокулятора, частка (0,02...0,1)	Х _{ін} = 0,1
Х _{кол} – засівна концентрація в колбі, частка (0,002...0,1)	Х _{кол} = 0,1
Е _ф – трати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1...0,2)	Е _ф = 0,2

Е _{па} – трати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка (0,1...0,2)	Е _{па} = 0,2
Е _{ін} - трати посівного матеріалу при його культивуванні в колбі, частка (0,1...0,2)	Е _{ін} = 0,2
Е _{кол} - трати посівного матеріалу в колбах, частка (0,01...0,02)	Е _{кол} = 0,02
СР _{пв} – відсоток сухих речовин в посівному матеріалі для засіву виробничих ферментерів, %	СР _{пв} = 10
СР _{ін} - відсоток сухих речовин в посівному матеріалі для засіву посівних апаратів, %	СР _{ін} = 10
СР _{ко} - відсоток сухих речовин в посівному матеріалі для засіву інокулятора, %	СР _{ко} = 10
СР _{кр} - відсоток сухих речовин в культуральній рідині, %	СР _{кр} = 3,5

Таблиця 4.1 – Склад поживного середовища для культивування *Trichoderma reesei*

Назва складників	Відсотки, %	Масова частка
Соєве борошно	1,08	0,0108
Вівсяне борошно	0,54	0,0054
Калій фосфорнокислий KH ₂ PO ₄	0,58	0,0058
Сірчаноокислий амоній (NH ₄) ₂ SO ₄	0,92	0,0092
Кальцій хлористий CaCl ₂	1,0	0,01
Магній сірчаноокислий MgSO ₄ x7H ₂ O	1,0	0,01
МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	1,07	0,0107
Лактоза	1,62	0,0162
Твін 80- полісорбат	0,1	0,001
Всього	7,91	0,0791

2. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

2.1 Кількість натуральних тон продукту в рік

$$G_{нт} = G_{ум} \cdot A_{yo} / A_{ст}; \quad G_{нт} = 121$$

2.2 Кількість продукту на добу, нат. т/добу

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд}; \quad G_{нтд} = 0,40$$

2.3 Кількість одиниць активності на добу з урахуванням

витрат на виробничий цикл ($E_{св}$), од.

$$A_{стд} = G_{нтд} * A_{ст} * 10^6 / (1 - E_{св});$$

$$A_{стд} = 1,9 * 10^8$$

2.4 Об'єм культуральної рідини на добу, м³/добу

$$V_{крд} = A_{стд} * 10^{-6} / A_{кр};$$

$$V_{крд} = 19,03$$

2.5 Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл),
м³

$$V_{кр} = 47,6$$

$$V_{кр} = V_{крд} * T_{цн} / 24 ;$$

2.6 Кількість ферментації (циклів) на рік

$$N_{цк} = 24 * T_{рд} / T_{цф};$$

$$N_{цк} = 123$$

2.7 Кількість фермента у натур. кг. за цикл, кг/цикл

$$G_{цк} = G_{нт} * 10^3 / N_{цк};$$

$$G_{цк} = 915,3$$

2.8 Вихід фермента у нат. кг за 1 м³

$$q_{нат} = G_{цк} / V_{кр};$$

$$q_{нат} = 19,22$$

2.9 Вихід фермента в умов. кг з 1 м³

$$q_{ум} = q_{нат} * A_{ст} / A_{уо};$$

$$q_{ум} = 14,5$$

3. Розрахунок складу поживного середовища для виробничих ферментерів посівних інокуляторів та качалочних колб

3.1. У відповідності з прийнятим складом поживного
середовища його витрати на $V_{кр}$ культуральної рідини
складають, т:

$$G_0 = V_{кр} * C_{\Sigma}$$

$$V_{кр} = 47,6$$

$$G_0 = 3,765$$

$$G_0 = 376$$

в тому числі, кг

Соєве борошно

$$g_1 = G_0 (C_1 / C_{\Sigma})$$

$$g_1 = 514$$

Вівсяне борошно

$$g_2 = G_0 (C_2 / C_{\Sigma})$$

$$g_2 = 257$$

Калій фосфорнокислий KH_2PO_4

$$g_3 = G_0 (C_3 / C_{\Sigma})$$

$$g_3 = 276$$

Сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$

$$g_4 = G_0 (C_4 / C_{\Sigma})$$

$$g_4 = 438$$

Кальцій хлористий $CaCl_2$

$$g_5 = G_0 (C_5 / C_{\Sigma})$$

$$g_5 = 476$$

Магній сірчаноокислий $MgSO_4 \times 7H_2O$	$g_6 = G_0(C_6/C_{\Sigma})$	$g_6 = 476$
МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	$g_7 = G_0(C_7/C_{\Sigma})$	$g_7 = 509$
Лактоза	$g_8 = G_0(C_8/C_{\Sigma})$	$g_8 = 771$
Твін 80- полісорбат	$g_9 = G_0(C_9/C_{\Sigma})$	$g_9 = 47$
Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг		$g_0 = 3765$

3.2. Розрахунок вихідної сировини на приготування поживного середовища для виробничої ферментації з урахуванням витрат ($E_{\Phi}, \%$)

$$G = G_0 / (1 - E_{\Phi}), \text{ кг} \quad G = 4704$$

в тому числі, кг

Соеве борошно	$G_{01} = G(C_1/C_{\Sigma})$	$G_{01} = 642$
Вівсяне борошно	$G_{02} = G(C_2/C_{\Sigma})$	$G_{02} = 321$
Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	$G_{03} = G(C_3/C_{\Sigma})$	$G_{03} = 345$
Сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$	$G_{04} = G(C_4/C_{\Sigma})$	$G_{04} = 548$
Кальцій хлористий $CaCl_2$	$G_{05} = G(C_5/C_{\Sigma})$	$G_{05} = 595$
Магній сірчаноокислий $MgSO_4 \times 7H_2O$	$G_{06} = G(C_5/C_{\Sigma})$	$G_{06} = 595$
МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	$G_{07} = G(C_5/C_{\Sigma})$	$G_{07} = 637$
Лактоза	$G_{08} = G(C_5/C_{\Sigma})$	$G_{08} = 964$
Твін 80- полісорбат	$G_{09} = G(C_5/C_{\Sigma})$	$G_{09} = 59$
Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг		$G_{\Sigma} = 4704$

3.3. Маса сухих речовин необхідних для засіву виробничих ферментерів ($CP_{\text{па}}, \%$), кг

$$G_2 = G * CP_{\text{па}} \quad G_2 = 470$$

3.4. Витрати сухи речовин поживного середовища ($CP_{\text{пм}}$) на приготування посівного матеріалу в посівних апаратах з врахуванням витрат ($E_{\text{па}}$), кг

$$G_3 = G_2 / (1 - E_{\text{па}}) \quad G_3 = 588$$

в тому числі, кг

Соеве борошно	$G'_{01} = G_3(C_1/C_{\Sigma})$	$G'_{01} = 80$
---------------	---------------------------------	----------------

Вівсяне борошно	$G'_{02}=G_3(C_2/C_\Sigma)$	$G'_{02}= 40$
Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	$G'_{03}=G_3(C_3/C_\Sigma)$	$G'_{03}= 43$
Сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$	$G'_{04}=G_3(C_4/C_\Sigma)$	$G'_{04}= 68$
Кальцій хлористий $CaCl_2$	$G'_{05}=G_3(C_5/C_\Sigma)$	$G'_{05}= 74$
Магній сірчаноокислий $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$G'_{06}=G_3(C_5/C_\Sigma)$	$G'_{06}= 74$
МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	$G'_{07}=G_3(C_5/C_\Sigma)$	$G'_{07}= 79$
Лактоза	$G'_{08}=G_3(C_5/C_\Sigma)$	$G'_{08}= 120$
Твін 80- полісорбат	$G'_{09}=G_3(C_5/C_\Sigma)$	$G'_{09}= 8$
Загальна витрата компонентів	$G_\Sigma=$	588

поживного середовища, кг

3.5. Маса сухих речовин у посівному матеріалі, який необхідний для засіву інокуляторів ($CP_{ін}, \%$), кг

$$G_4= 58$$

$$G_4=G_3 \cdot CP_{ін}$$

3.6. Витрати сухих речовин поживного середовища ($CP_{пн}$) на приготування посівного матеріалу в інокуляторах з врахуванням втрат ($E_{ін}$), кг

$$G_5= 73$$

$$G_5=G_4/(1-E_{ін})$$

в тому числі, кг

Соеве борошно	$G''_{01}=G_5 (C_1/C_\Sigma)$	$G''_{01}= 10$
Вівсяне борошно	$G''_{02}=G_5 (C_2/C_\Sigma)$	$G''_{02}= 5$
Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	$G''_{03}=G_5 (C_3/C_\Sigma)$	$G''_{03}= 5,4$
Сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$	$G''_{04}=G_5 (C_4/C_\Sigma)$	$G''_{04}= 8,5$
Кальцій хлористий $CaCl_2$	$G''_{05}=G_5 (C_5/C_\Sigma)$	$G''_{05}= 9,3$
Магній сірчаноокислий $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$G''_{05}=G_5 (C_5/C_\Sigma)$	$G''_{05}= 9,3$
МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	$G''_{05}=G_5 (C_5/C_\Sigma)$	$G''_{05}= 9,9$
Лактоза	$G''_{05}=G_5 (C_5/C_\Sigma)$	$G''_{05}= 15$
Твін 80- полісорбат	$G''_{05}=G_5 (C_5/C_\Sigma)$	$G''_{05}= 1$

Загальна витрата компонентів $G_{\Sigma 5} = 73$

поживного середовища, кг

3.7. Маса сухих речовин у посівному матеріалі, який необхідний для засіву

колб ($C_{\text{кол}}$, %), кг $G_6 = 7,3$

$$G_6 = G_5 \cdot C_{\text{кол}}$$

3.8. Витрати сухих речовин поживного середовища ($C_{\text{кол}}$)

на приготування посівного матеріалу в

колбах з врахуван $G_7 = 7,2$

ням витрат ($E_{\text{ко}}$), кг

$$G_7 = G_6(1 - E_{\text{кол}})$$

в тому числі, кг

Соеве борошно $G''_{01} = G_7 (C_1/C_{\Sigma})$ $G''_{01} = 1,0$

Вівсяне борошно $G''_{02} = G_7 (C_2/C_{\Sigma})$ $G''_{02} = 0,5$

Калій фосфорнокислий KH_2PO_4 $G''_{03} = G_7 (C_3/C_{\Sigma})$ $G''_{03} = 0,5$

Сірчаноокислий амоній $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $G''_{04} = G_7 (C_4/C_{\Sigma})$ $G''_{04} = 0,8$

Кальцій хлористий CaCl_2 $G''_{05} = G_7 (C_5/C_{\Sigma})$ $G''_{05} = 0,9$

Магній сірчаноокислий $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $G''_{06} = G_7 (C_5/C_{\Sigma})$ $G''_{06} = 0,9$

МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0) $G''_{07} = G_7 (C_5/C_{\Sigma})$ $G''_{07} = 0,98$

Лактоза $G''_{08} = G_7 (C_5/C_{\Sigma})$ $G''_{08} = 1,5$

Твін 80- полісорбат $G''_{09} = G_7 (C_5/C_{\Sigma})$ $G''_{09} = 0,1$

Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг $G_{\Sigma 7} = 7,2$

4. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу

4.1. Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничих ферментерах з врахуванням витрат при біосинтезі ($E_{\text{ф}}$), м³

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) \quad V_{\text{ф}} = 59,6$$

4.2. Витрати посівного матеріалу на засів виробничих

ферментерів ($X_{вф}$), m^3

$$V_{пмф} = V_{ф} * X_{вф} \quad V_{пмф} = 5,96$$

4.3. Об'єм готового поживного середовища для виробничих ферментерів, m^3

$$V_{псф} = V_{ф} - V_{пмф} \quad V_{псф} = 53,64$$

4.4. Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у посівних апаратах ($E_{па}$), m^3

$$V_{па} = V_{пмф} / (1 - E_{па}) \quad V_{па} = 7,45$$

4.5. Витрати посівного матеріалу на засіів посівних апаратів ($X_{па}$), m^3

$$V_{пмп} = V_{па} * X_{па} \quad V_{пмп} = 0,745$$

4.6. Об'єм готового поживного середовища для посівних апаратів, m^3

$$V_{псп} = V_{па} - V_{пмп} \quad V_{псп} = 6,705$$

4.7. Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторах з врахуванням витрат при культивуванні в інокуляторах ($E_{ін}$), m^3

$$V_{ін} = V_{пмп} / (1 - E_{ін}) \quad V_{ін} = 0,93$$

4.8. Витрати посівного матеріалу на засів інокуляторів ($X_{ін}$), m^3

$$V_{інм} = V_{ін} * X_{ін} \quad V_{інм} = 0,093$$

4.9. Об'єм готового поживного середовища для інокуляторів, m^3

$$V_{псі} = V_{ін} - V_{інм} \quad V_{псі} = 0,837$$

4.10. Об'єм посівного матеріалу в колбах з урахуванням втрат при культивуванні в колбах ($E_{кол}$), m^3

$$V_{кол} = V_{інм} / (1 - E_{кол}) \quad V_{кол} = 0,095$$

5. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища виробничих ферментерів, посівних апаратів, інокуляторів

5.1. Розбавлення поживного середовища в інокуляторах конденсатом пари при його стерилізації (15%), м³

$$V_{\text{інк}} = V_{\text{псі}} - 0,15$$

$$V_{\text{інк}} = 0,687$$

5.2. Витрати води на приготування поживного середовища в інокуляторах з врахуванням конденсату пари при стерилізації (15%), м³

$$V_{\text{ві}} = V_{\text{псі}} - (G5/1000) - V_{\text{інк}}$$

$$V_{\text{ві}} = 0,077$$

5.3. Розроблення поживного середовищ посівних апаратах конденсатом пари при його стерелізації (15%), м³

$$V_{\text{пак}} = (V_{\text{псп}} * 0,15)$$

$$V_{\text{пак}} = 1,006$$

5.4. Витрати води на приготування поживного середовища в посівних апаратах з врахуванням конденсату пари при стерилізації (15%), м³

$$V_{\text{впа}} = V_{\text{псп}} - (G3/1000) - V_{\text{пак}}$$

$$V_{\text{впа}} = 5,111$$

5.5. Розбавлення виробничого поживного сеердовища в УСБ конденсатом пари при його стерелізації (20%), м³

$$V_{\text{фк}} = (V_{\text{пс}} * 0,2)$$

$$V_{\text{фк}} = 11,92$$

5.6. Витрати води на приготування виробничого поживного середовища з врахуванням конденсату пари при стерелізації у УБС (20%), м³

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - (G/1000) - V_{\text{фк}}$$

$$V_{\text{вф}} = 37,016$$

5.7. Загальна кількість води на приготування поживного середовища, м³

$$V_{\Sigma} = V_{\text{вф}} + V_{\text{впа}} + V_{\text{ві}}$$

$$V_{\Sigma} = 42,204$$

6. Розрахунок маси сухих речовин при культивуванні

6.1. Розрахунок сухих речовин в культуральній рідині

$$G_{\text{кр}} = V_{\text{кр}} - C P_{\text{кр}}$$

$$G_{\text{кр}} = 44,1$$

6.2. Витрати сухих речовин на культивування, т

$$G_{\text{втр}} = G - G_{\text{кр}}$$

$$G_{\text{втр}} = 4,6599$$

6.3. Вихід готової культуральної рідини з ферментерів з врахуванням витрат ($E_{\text{ф}}$), м³

$$V_{\text{кр}} = V_{\text{ф}} - (V_{\text{ф}} * E_{\text{ф}})$$

$$V_{\text{кр}} = 47,68$$

7. Розрахунок кількості виробничих ферментерів

7.1. Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому K_3 , м³

$$V_{\text{фг}} = V_{\text{ф}} / K_3$$

$$V_{\text{фг}} = 85,14$$

7.2. Вибираємо з таблиці 1 найближчий за об'ємом ферментер, м³

$$V_{\text{фг}} = 100$$

7.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 , м³

$$N_{\text{фр}} = K_1 * V_{\text{фг}} / V_{\text{фг}}$$

$$N_{\text{фр}} = 1,27$$

7.4. Приймаємо до установки кількість ферментерів

$$N_{\text{фг}} + 1 \text{ запасний}$$

$$N_{\text{фг}} = 2$$

7.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка, $K_{3\text{ф}}$

$$K_{3\text{ф}} = V_{\text{ф}} / (V_{\text{фг}} * N_{\text{фг}})$$

$$K_{3\text{ф}} = 0,7$$

8. Розрахунок кількості посівних апаратів

8.1. Приблизний загальний геометричний об'єм посівних апаратів при заданому $K_{\text{па}}$, м³

$$V_{\text{паг}} = V_{\text{па}} / K_{\text{па}}$$

$$V_{\text{паг}} = 10,64$$

8.2. Вибираємо з таблиці 1 найближчий за об'ємом посівний апарат, м³

$$V_{\text{пат}} = 20$$

8.3. Кількість посівних апаратів при заданому $K_{\text{пл}}$, м³

$$N_{\text{па}} = K_1 * V_{\text{паг}} * T_{\text{цп}} / (24 * V_{\text{пат}})$$

$$N_{\text{па}} = 0,40$$

8.4. Приймаємо до установки посівних апаратів

$$N_{\text{па}} + 1 \text{ запасний}$$

$$N_{\text{пат}} = 2$$

8.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів, частка, $K_{\text{пат}}$

$$K_{\text{пат}} = V_{\text{па}} / (V_{\text{пат}} * N_{\text{пат}})$$

$$K_{\text{пат}} = 0,5$$

9. Розрахунок кількості інокуляторів

9.1. Приблизний загальний геометричний об'єм інокуляторів при заданому $K_{\text{ін}}$, м^3

$$V_{\text{іна}} = V_{\text{ін}} / K_{\text{ін}}$$

$$V_{\text{іна}} = 1,69$$

9.2. Вибираємо з таблиці 1 найближчий за об'ємом інокулятор, м^3

$$V_{\text{інт}} = 2$$

9.3. Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{ін}}$

$$N_{\text{іна}} = K_1 * V_{\text{іна}} * T_{\text{ці}} / (24 * V_{\text{інт}})$$

$$N_{\text{іна}} = 0,79$$

9.4. Приймаємо до установки посівних інокуляторів

$$N_{\text{інт}} + 1 \text{ запасний}$$

$$N_{\text{інт}} = 2$$

9.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці інокуляторів, частка, $K_{\text{інт}}$

$$K_{\text{інт}} = V_{\text{ін}} / (V_{\text{інт}} * N_{\text{інт}})$$

$$K_{\text{інт}} = 0,8$$

10. Розрахунок кількості збірників культуральної рідини

10.1. Приблизний загальний геометричний об'єм збірника при заданому $K_{\text{зб}}$, м^3

$$V_{\text{зб}} = V_{\text{кр}} / K_{\text{зб}}$$

$$V_{\text{зб}} = 59,5$$

10.2. Вибираємо з таблиці найближчий за об'ємом збірник, м^3

$$V_{\text{збт}} = 0,89$$

10.3. Кількість збірників при заданому $K_{\text{зв}}$, м^3

$$N_{\text{зб}} = K_1 * V_{\text{зб}} / V_{\text{збт}}$$

$$N_{\text{зб}} = 0,90$$

10.4. Приймаємо до установки збірників

$$N_{\text{збт}} + 1 \text{ запасний}$$

$$N_{\text{збт}} = 2$$

10.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці збірників, частка, $K_{\text{збт}}$

$$K_{\text{збт}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{збт}} * N_{\text{збт}}$$

$$K_{\text{збт}} = 1,90$$

МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДНУ ФЕРМЕНТАЦІЮ (ПАРТІЮ)

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм ³
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
1.1.	Соеве борошно	10	Поживне середовище (нестерильне)	140,4
1.2.	Вівсяне борошно	5		
1.3.	Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	5,4		
1.4.	Сірчанокислий амоній $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,5		
1.5.	Кальцій хлористий CaCl_2	9,3		
1.6.	Магній сірчанокислий $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	9,3		
1.7.	МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	9,9		
1.8.	Лактоза	15		
1.9.	Твін 80- полісорбат	1		
1.10.	Вода	77		
	Всього	140,4	Всього	140,4
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В ІНОКУЛЯТОРАХ			
2.1.	Нестерильне поживне середовище	140,4	ПС стерилізоване в апараті	161,5
2.2.	(Конденсат – 15% води)	21,1	(втрат немає)	0
	Всього	161,5	Всього	161,5
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРАХ			
3.1.	ПС стерилізоване в апараті	161,5	Посівний матеріал	161,5
3.2.	Посівний матеріал з колб	9,29		
3.3.	Втрати (частка)	0,02		9,29
	Всього	170,8	Всього	170,8
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ			
4.1.	Соеве борошно	80	Поживне середовище (нестерильне)	5688
4.2.	Вівсяне борошно	40		
4.3.	Калій фосфорнокислий	43		

	KH_2PO_4			
4.4.	Сірчаноокислий амоній (NH_4) $_2\text{SO}_4$	68		
4.5.	Кальцій хлористий CaCl_2	74		
4.6.	Магній сірчаноокислий $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	74		
4.7.	МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	79		
4.8.	Лактоза	120		
4.9.	Твін 80- полісорбат	8		
4.10.	Вода	5100		
	Всього	5688	Всього	5688
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В ПОСІВНИХ АПАРАТАХ			
5.1.	Нестерильне поживне середовище	5688	ПС стерилізоване в апараті	5688
5.2.	(Конденсат – 15% води)	765	(втрат немає)	0
	Всього	6463	Всього	6463
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНИХ АПАРАТАХ			
6.1.	Поживне середовище	6463	Посівний матеріал	6492
6.2.	Посівний матеріал з інокулятора	161,5		
6.3.	Втрати (частка)	0,02	Втрати (кількість)	132
	Всього	6624	Всього	6624
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
7.1.	Соеве борошно	642	Поживне середовище (нестерильне)	41720
7.2.	Вівсяне борошно	321		
7.3.	Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	345		
7.4.	Сірчаноокислий амоній (NH_4) $_2\text{SO}_4$	547		
7.5.	Кальцій хлористий CaCl_2	595		
7.6.	Магній сірчаноокислий $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	595		
7.7.	МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	636		
7.8.	Лактоза	964		
7.9.	Твін 80- полісорбат	59		
7.10.	Вода	37016		
	Всього	41720	Всього	41720
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			

8.1.	Нестерильне поживне середовище	41720	ПС стерилізоване в апараті	41720
8.2.	(Конденсат – 20% води)	7390	(втрат немає)	0
	Всього	49110	Всього	49110
9.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ			
9.1.	Стерильне поживне середовище	49110	Культуральна рідина на фільтрацію	49110
9.2.	Посівний матеріал з посівних апаратів	6624		
9.3.	Втрати (частка)	0,10	Втрати (кількість)	4911
	Всього	55734	Всього	55734

НОРМИ ЧАСУ НА ПРОВЕДЕННЯ ОПЕРАЦІЙ

Операція	Апарат	Процес	Час операції, год.
Вирощування посівної культури	Інокулятор (посівний апарат)		
Мийка та огляд апарату			1
Перевірка на герметичність			0,5
Підігрів апарату			0,5
Стерилізація апарату			0,5
Охолодження апарату			0,5
Завантаження середовища			0,5
Стерилізація середовища			0,5
Охолодження середовища та засів культурою			2
Вирощування посівної культури			15
Разом:			21
Ферментація	Ферментер		
Мийка та огляд апарату			1,5
Перевірка на герметичність			0,5
Підігрів апарату			0,5
Стерилізація апарату			0,5
Охолодження апарату			0,5
Завантаження середовища			1,5
Засів культури			0,5
Ферментація			60
Звільнення ферментера від культурної рідини			0,5
Разом:			66

ЗВЕДЕНА ТАБЛИЦЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДАНИХ

Таблиця 4.2 - Результати розрахунку

№ з/п	Найменування показника	Один. виміру	Умов. позначення	Значення
	Культура біологічного агенту – <i>Trichoderma reesei</i>			
1.	Потужність виробництва в умовних тонах ферменту	ум. т/рік	$G_{yt} =$	85
2.	Кількість робочих днів у рік	дн.	$T_{рд} =$	308
3.	Стандартна активність препарату	од/г	$A_{ст} =$	3500
4.	Умовна активність препарату	од/г	$A_{yo} =$	5000
5.	Активність культуральної рідини	од/мл	$A_{кр} =$	10
6.	Час циклу роботи ферментера	год.	$T_{цф} =$	60
7.	$T_{цп}$ – час циклу роботи посівного апарата	год.	$T_{цп} =$	15
8.	$T_{ці}$ – час циклу роботи інокулятора	год.	$T_{ці} =$	15
9.	Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл)	м ³	$V_{кр} =$	47,6
10.	Кількість ферментацій (циклів) на рік	цикл/рік	$N_{цк} =$	123
11.	Кількість фермента у натур. кг за цикл	кг/цикл	$G_{цк} =$	985,6
12.	Вихід фермента у натуральних кг з 1 м ³	нат.кг/м ³	$q_{нат} =$	19,22
13.	Вихід фермента в умовних кг з 1 м ³	ум.кг/м ³	$q_{ум} =$	1,45
14.	Об'єм виробничого ферментера	м ³	$V_{фт} =$	100
15.	Кількість виробничих ферментерів	од.	$N_{фт} =$	1+1
16.	Об'єм посівного апарату	м ³	$V_{пат} =$	25
17.	Кількість посівних апаратів	од.	$N_{пат} =$	1+1
18.	Об'єм інокулятора	м ³	$V_{інт} =$	2
19.	Кількість інокуляторів	од.	$N_{інт} =$	1+1
20.	Об'єм збірника	м ³	$V_{збт} =$	100
21.	Кількість збірників	од.	$N_{збт} =$	2+1

4.2 Викладення удосконаленого технологічного процесу отримання β -глюканаз штамом *Trichoderma reesei* штаму М-4 (загальні вимоги)

ДР1 Санітарна підготовка виробництва

Розвиток біотехнологій вимагає з боку організації техніки безпеки пильної уваги до створення безпечних і безаварійних умов праці на підприємствах цієї галузі. На кожному біотехнологічному підприємстві, перед

тим як допустити персонал до роботи, він проходить навчання та інструктаж. Інструктаж персоналу проводиться кожен рік. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся під хустинку або ковпак, зняти з себе прикраси, змити лак з нігтів, ретельно вимити руки теплою водою з милом і продезінфікувати їх. Кожен працівник на підприємстві несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, за стан робочого місця, за виконання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці. Інвентар, що застосовується для миття і очищення, слід вибирати і використовувати так, щоб він не став джерелом контамінації. Для миття та дезінфекції стін, підлоги, стелі промиваються мийними розчинами для видалення пилу та органічних залишків. Поверхні зрошують або протирають розчинами дезінфікуючих засобів. Проводиться дезінфекція раз на місяць для запобігання резистентності мікрофлори. Через технологічне обладнання пропускають миючий засіб. З'ємні частини (вузли) обладнання вимиваються в розчині миючого засобу при температурі 70 – 80 °С. Підготовка виробничих приміщень одне з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти під час виробничого процесу.

ДР2. Підготовка повітря

Удосконалений технологічний процес отримання β -глюканаз штамом *Trichoderma reesei* М-4 вимагає суворого дотримання асептичних умов. Культура *T. reesei* є аеробною, тому безперервна подача стерильного повітря є критичним фактором для забезпечення високого виходу ферменту та запобігання сторонній контамінації. Процес підготовки повітря здійснюється у кілька послідовних етапів.

1. *Забір повітря та грубе очищення.* Атмосферне повітря забирається через повітрозабірну шахту і проходить через фільтр грубої очистки (ФГО) для видалення великих часток пилу.

2. *Стиснення повітря.* Повітря стискається за допомогою безмасляних компресорів (наприклад, гвинтових або турбокомпресорів) до тиску 0,3–0,4

МПа. Використання безмасляних компресорів є обов'язковим, щоб виключити потрапляння парів мастила у ферментаційне середовище.

3. *Охолодження та вологовідділення.* При стисненні повітря нагрівається до 110–150° С. Його охолоджують у теплообміннику до температури 20–25° С. При цьому конденсується волога, яка відділяється у вологовідділювачі.

4. *Фільтрація вологоуловлювання та підігрі.* Повітря пропускають через вугільно-волокнистий або патронний фільтр попереднього очищення. Перед подачею на стерилізуючі фільтри повітря підігрівають у калорифері на 3–5° С вище точки роси, щоб знизити його відносну вологість до 60–70 % - це запобігає зволоженню фільтрувального матеріалу головних фільтрів.

5. *Стерилізуюча фільтрація.* Повітря проходить крізь головні стерилізуючі фільтри (ГСФ) патронного типу з гідрофобними. Ефективність затримання мікроорганізмів та часток на цьому етапі має становити не менше 99,9999 %. Ці загальні вимоги забезпечують безперебійну подачу стерильного та сухого повітря. Повітря стерилізується додатково на індивідуальних фільтрах, які встановлено безпосередньо перед інокулятором та основними ферментером.

ДР 3. Приготування поживного середовища

У реактор-змішувач подається розрахована кількість води, підігрітої до температури 40–45° С. Розчини поживних солей готують в окремих збірниках та подають у збірник ПС, інокулятор або ферментер при компонуванні компонентів у розрахованих кількостях. Необхідні солі: KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у відповідних пропорціях подають до вагових дозаторів. Компоненти середовища гомогенізуються в реакторі протягом 15 хвилин за допомогою якірної мішалки, що працює на швидкості 50 об/хв.

Після повного розчинення солей вноситься лактоза та Твін-80. Останніми при безперервному та інтенсивному перемішуванні дозуються сухі суспензійні компоненти: соєве борошно, вівсяне борошно та МКЦ, Це запобігає утворенню конгломератів. Сухі компоненти спочатку подаються до вагових дозаторів та вивантажуються до апарату. Температура при гомогенізації сухих компонентів

не повинна перевищувати 60° С до моменту повної подачі, щоб уникнути передчасної клейстеризації крохмалю, яка може призвести до різкого зростання в'язкості середовища ще до початку стерилізації. Оскільки МКЦ та борошно схильні до швидкого осадження, мішалка змішувача повинна працювати у високообертovому режимі протягом усього циклу приготування. Перед стерилізацією обов'язково вимірюється початкове значення рН суспензії. Для штаму *Trichoderma reesei* М-4 воно має становити 5,4–5,6 (залежно від складу середовища).

У разі відхилень показник коригується 10% розчином соляної кислоти або розчином аміаку.

Стерилізація ПС відбувається безпосередньо в інокуляторі за рахунок подавання перегрітої пари за температури 120°С протягом 40 хвилин.

Потім ПС охолоджується до 80°С стерильним повітрям і тільки після цього водою, яку подають у сорочку інокулятора, для досягнення оптимальної температури вирощування.

ТП4. Підготовка засівної культури

Чиста культура *T. reesei* М-4 зберігається у ліофілізованому стані за низьких температур або на скошеному сусло-агарі в ампулах. Культуру пересівають в чашки Петрі та інкубують у термостаті при температурі 28-30° С протягом 7–10 діб. Стерильною дистильованою водою з додаванням 0,05% Твін-80 змивають спори з поверхні агару в асептичних умовах. Концентрацію спор контролюють у камері Горяєва. Суспензію спор вносять у стерильні колби з рідким посівним середовищем. Колби з культурою розміщуються на качалках при частоті обертання 220-240 об/хв і інкубуються при температурі 28-29° С протягом 48-72 годин. Після цього культура перевіряється на морфологічні та культуральні характеристики, а також на мікробіологічну чистоту. Накопичувальна культура засівається в інокулятор.

Накопичення культури *T. reesei* М-4 в інокуляторі відбувається за

температури 28° С протягом 24–36 годин на рідкому поживному середовищі, яке за концентрацією поживних речовин складає 0,5 % від їх концентрації у основному ферментері. Інокулятор має перемішувачий пристрій (не більше 30 – 60 об/хв для того, щоб запобігти надлишкових зрізових зусиль). До інокулятора подається стерильне повітря у об'ємі 0,5 м³/год на 1м³ ПС на початку ферментації і 0,8 – 1.0 м³/год на 1м³ ПС через дві доби вирощування продуцента.

ТП5. Виробниче культивування

Основний процес вирощування продуцента

Підготовлені стерильні компоненти поживного середовища подають до ферментера згідно з ДР 3. Підготовлений посівний матеріал з ТП4 передається у виробничий ферментер. Для аеробного процесу важливим є постійне насичення середовища киснем та ефективне перемішування при з невеликими обертами перемішувального пристрою (30–60 об/хв.).

Культивування триває до 60-72 години при рН 3,7-4,7.

Процес основного культивування перших кілька діб відбувається за температури 30-32°C, а далі температуру знижують до 22°C.

ТП 6. Виділення та очищення препарату з *Trichoderma reesei*

На початковому етапі технологічного процесу культуральна рідина, що містить біомасу продуцента, транспортується методом витіснення стисненим повітрям під тиском 0,35 МПа зі збірника на сепараційну установку. У сепараторі відбувається механічне відділення гіфів грибною культури від рідкої фази. Пройдений сепарацію розчин, очищений від міцелію, спрямовується у проміжний збірник.

Подальше очищення та концентрування ферментного розчину здійснюються у дві стадії:

1. **Попередня фільтрація.** Розчин зі збірника подається на рамний фільтр. Як фільтрувальна перегородка застосовується спеціалізований низькозольний

картон із бавовняної целюлози (FibraFix®, Італія) товщиною 2–4 мм. Це дозволяє видалити дрібнодисперсні зважені частинки.

2. **Ультрафільтраційне концентрування.** Освітлений розчин спрямовується на ультрафільтраційну установку, яка оснащена керамічними фільтрами ECOSOFT UF-30. Подавання розчину здійснюється під надлишковим тиском 0,6–1,0 МПа. Заданий гідродинамічний режим забезпечує високу швидкість потоку, за якої легкі супутні сполуки проходять уздовж поверхні мембрани, а цільові високомолекулярні ферменти (із молекулярною масою до кількох мільйонів Дал) ефективно утримуються порами фільтра без втрати нативної біологічної активності.

Внаслідок ультрафільтраційного концентрування активність ферменту в отриманому розчині досягає 40–50 одиниць.

Контроль та визначення ферментативної активності ендо- β -глюканази на цьому етапі виконуються у строгій відповідності до регламентованих методик згідно з ДСТУ 8484:2015 («Препарати ферментні. Методи визначання активності») або ГОСТ 34176-2017 («Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности эндо- β -глюканазы»).

ТП 10. Приготування препаративної форми продукту.

Основна мета стадії – це забезпечення тривалої стабільності β -глюканазної активності при зберіганні, надання продукту зручної для кінцевого споживача (порошкової форми), а також точна стандартизація препарату за ферментативною активністю відповідно до вимог ТУ чи ДСТУ.

До ферментного розчину додають стабілізатори солі (сульфат кальцію, хлорид натрію), які не тільки стабілізують препарат а й захищають від втрати активності при висушуванні.

ПМВ 11. Фасування, пакування, відвантаження

Процес здійснюється у стерильних умовах, щоб уникнути мікробіологічного забруднення готового продукту. Сухий порошок подається

на фасування через закриті герметичні шнекові або вакуум-транспортери, обладнані локальною системою аспірації (витяжки) для запобігання пиленню та захисту дихальних шляхів персоналу від алергенного впливу ферментного пилу. Тара має забезпечувати герметичність, захист від вологи та ультрафіолетового випромінювання. Для порошків використовують багатошарові крафт-мішки з поліетиленовими вкладишами або герметичні пластикові відра. Фасування здійснюється ваговими автоматами-дозаторами в тару: багатошарові паперові мішки по 20 кг або 25 кг; м'які контейнери з вологозахисним полімерним вкладишем місткістю 500 кг та 1000 кг (для відвантаження на комбікормові заводи). Перевезення здійснюється спеціалізованим транспортом з дотриманням температурного режиму, зазначеного в регламенті виробника.

ПВ11. Знешкодження відходів та викидів

Залишки середовищ, розчини збираються та проходять обов'язкову потокову стерилізацію при 120° С для виключення потрапляння промислового штаму у відкриту гідромережу. Контроль за роботою стадії ПВ11 здійснюється екологічною лабораторією: 1. повна відсутність життєздатних клітин *Trichoderma reesei* М-4 у висушеному осаді та скидних стоках (контроль методом посіву на сусло-агар); 2. моніторинг чистоти атмосферного повітря на межі підприємства на відсутність специфічних запахів та мікробного обсіменіння.

4.3 Схема постадійного контролю біосинтезу β – глюканази Г20х з *Trichoderma reesei* штам4

Для отримання готового продукту належної якості необхідним є здійснення контролю виробництва. Основні контрольні точки, об'єкти, показники та їх нормативні характеристики наведені в таб. 4.3.

Таблиця 4.3 - Контрольні точки та їх номінативні характеристики

№ п/п	Стадія контролю	Показник, що контролюється	Нормативна характеристика показника, що визначається	Періодичність перевірки
1	Приготування робочого розчину	Концентрація розчину		Після приготування розчину
2	Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду	Після прибирання
3	Миття з'ємних частин обладнання	З'ємні частини обладнання, мийний розчин, температура мийного розчину, чистота	Хлорамін Б, $t = 50-60^{\circ}\text{C}$	Під час проведення операції
4	Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота	Хлорамін Б, $t = 60^{\circ}\text{C}$, $\tau = 1\text{ год}$	Під час проведення операції обробки
5	Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	$P = 0,3\text{ МПа}$, $t = 140^{\circ}\text{C}$, $\tau = 1\text{ год}$	Тиск визначається безперервно під час стерилізації
6	Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	$E = 80\%$, $P = 0,2\text{ МПа}$	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення
7	Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	$P = 0,2\text{ МПа}$, $t = 100-140^{\circ}\text{C}$	Після компресування повітря
8	Охолодження повітря температура	Охолоджене повітря,	$t = 25-40^{\circ}\text{C}$	Після охолодження повітря
9	Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	$W = 60\%$	Після видалення зайвої вологи
10	Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	$t = 100-140^{\circ}\text{C}$	Після нагрівання Повітря
11	Тонке очищення повітря	Очищення повітря, ступінь очищення, перепад тисків	$E = 95\%$	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення

12	Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищення повітря, ступінь очищення	E = 99,999%	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі
13	Приготування та стерилізація поживного середовища	Поживне середовище, температура, час, рН, стерильність	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти, рН 7	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації
14	Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	t = 30°C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти	Після вирощування культури в колбах на качалках
15	Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	t = 30°C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу
16	Виробничий біосинтез	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	t = 30°C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти,	Під час вирощування культури у ферментері
17	Фільтрування	Температура, швидкість, режим	t=30°C, відсутність сторонньої мікробіоти	Безперервно після ферментування
19	Термічна обробка	Температура, тривалість термічної обробки	t = 60°C, τ = 2-3 год	Під час термічної обробки
20	Сушка	Температура, після видалення зайвої вологи	t = 20-25°C, W = 10%	Після видалення зайвої вологи

РОЗДІЛ 5.

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

5.1 Виробничі фактори, що впливають на навколишнє середовище при виробництві ферментів

У сучасній біотехнологічній промисловості особливої актуальності набувають питання мінімізації негативного впливу виробничих процесів на навколишнє середовище та здоров'я працівників. Виробництво ферментних препаратів, зокрема β -глюканази, пов'язане з використанням мікроорганізмів-продуцентів, що зумовлює наявність специфічних біологічних факторів ризику.

Під час культивування продуцентів та подальших технологічних операцій у навколишнє середовище можуть надходити значні обсяги забруднених стічних вод і газоповітряних викидів. До їх складу входять мікроорганізми, залишки поживних середовищ, продукти метаболізму, а також органічні та мінеральні речовини. Через складний багатокомпонентний склад такі відходи потребують ефективного очищення перед скиданням або викидом у довкілля [57].

У процесі виробництва β -глюканази працівники можуть зазнавати впливу несприятливих факторів виробничого середовища, серед яких важливе місце посідають параметри мікроклімату та біологічні агенти.

Підвищений вміст мікроорганізмів у повітрі виробничих приміщень може негативно позначатися на стані здоров'я персоналу. Потрапляючи до органів дихання, спори та клітини мікроорганізмів здатні осідати на слизових оболонках, колонізувати їх та виділяти біологічно активні речовини, які можуть викликати розвиток патологічних процесів [58].

Результати сучасних досліджень свідчать, що потенційну загрозу становлять не лише цілі клітини мікроорганізмів і їх спори, але й дрібнодисперсні клітинні фрагменти. Частинки розміром менше 2,5 мкм можуть тривалий час перебувати в повітрі та проникати у глибокі відділи

дихальної системи. Встановлено, що значна частина імунологічно активних аерозольних частинок має розміри, менші за розміри спор мікроорганізмів. Особливу небезпеку становлять ультрадисперсні частинки розміром близько 0,3 мкм, концентрація яких може в сотні разів перевищувати кількість спор.

Мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності здатні спричиняти розвиток алергічних реакцій, захворювань органів дихання та інших порушень здоров'я. Для осіб зі зниженим імунітетом існує ризик виникнення інфекційних уражень. Основними шляхами надходження біологічних агентів до організму людини є дихальна система та шлунково-кишковий тракт [59].

Таким чином, під час удосконалення технології виробництва ферментного препарату β -глюканази необхідно передбачати комплекс заходів, спрямованих на зменшення викидів біологічних агентів, очищення стічних вод і повітря, а також забезпечення безпечних умов праці для виробничого персоналу.

5.2 Методи очищення стічних вод при виробництві ферментів

Одним із важливих напрямів забезпечення екологічної безпеки біотехнологічних виробництв є ефективне очищення стічних вод, що утворюються в процесі виробництва ферментних препаратів. Під час одержання β -глюканази стічні води можуть містити залишки поживних середовищ, продукти метаболізму мікроорганізмів-продуцентів, завислі речовини, мінеральні солі та інші органічні сполуки. Без належного очищення такі стоки можуть негативно впливати на стан водних екосистем та спричиняти додаткове навантаження на міські очисні споруди [60].

Для очищення виробничих стічних вод застосовують комплекс механічних, фізико-хімічних та біологічних методів. На початковому етапі здійснюють видалення грубодисперсних домішок шляхом відстоювання, фільтрування або використання спеціальних решіток і сіток. Подальше

очищення може включати коагуляцію, флотацію та сорбційні методи, які забезпечують зниження концентрації органічних забруднювачів [61].

Особливу роль у підготовці стічних вод до скидання відіграють біологічні методи очищення, засновані на здатності мікроорганізмів окиснювати органічні речовини до безпечних сполук. Для цього використовують аеротенки, біофільтри та інші біологічні очисні споруди, що забезпечують зменшення показників біохімічного та хімічного споживання кисню [61].

Ефективним природоохоронним заходом є впровадження замкнених систем водопостачання. Після відповідного очищення воду можна повторно використовувати у виробничому циклі, зокрема для миття технологічного обладнання та тари, охолодження апаратури, а також у теплообмінних системах. Організація оборотного водопостачання дозволяє суттєво скоротити споживання свіжої води, зменшити обсяг стічних вод та знизити антропогенне навантаження на навколишнє середовище [62].

5.2.1 Механічні методи усунення забруднень

Механічне очищення є початковим етапом обробки стічних вод, що утворюються під час виробництва ферментного препарату β -глюканаз. Основним призначенням цього методу є видалення нерозчинних домішок органічного та неорганічного походження. Завдяки відносній простоті реалізації та низьким експлуатаційним витратам механічне очищення належить до найбільш економічно ефективних способів підготовки стічних вод до подальшої обробки. Залежно від складу стоків ефективність видалення нерозчинних забруднень може досягати 60–75 % [63].

Для здійснення механічного очищення використовують комплекс спеціального обладнання, до складу якого входять решітки, сита, пісколовки, відстійники та фільтрувальні установки. На першому етапі стічні води пропускають через решітки або самоочищувальні фільтрувальні системи,

призначені для затримання великих механічних домішок. Як правило, такі пристрої забезпечують вилучення частинок розміром понад 16 мм.

Після попереднього очищення стоки надходять до пісколовок, де під дією сили тяжіння осаджуються мінеральні частинки високої густини, зокрема пісок та інші тверді включення. Для видалення жирів, масел та інших гідрофобних речовин застосовують жировловлювачі або флотаційні установки, в яких забруднювачі концентруються на поверхні рідини та видаляються механічним способом.

Для вилучення дрібнодисперсних завислих частинок використовують процес фільтрування через зернисті матеріали або спеціальні мембранні елементи. Мембранні технології забезпечують високий ступінь очищення та дозволяють ефективно затримувати частинки малого розміру, що особливо важливо для біотехнологічних виробництв.

Завершальним етапом механічного очищення є відстоювання стічних вод у первинних відстійниках. У цих спорудах відбувається осадження завислих речовин під дією гравітаційних сил, що сприяє зниженню навантаження на наступні стадії фізико-хімічного та біологічного очищення [63].

5.2.2 Фізико-хімічні методи усунення забруднень

Фізико-хімічні методи очищення є важливою складовою комплексної системи підготовки стічних вод, що утворюються під час виробництва ферментного препарату β -глюканази. Застосування цих методів дає змогу ефективно видаляти завислі речовини, колоїдні частинки, розчинені органічні сполуки та інші забруднювачі, які не можуть бути повністю усунуті механічними способами.

Сутність фізико-хімічного очищення полягає у використанні спеціальних реагентів, зокрема коагулянтів і флокулянтів, які взаємодіють із забруднювальними речовинами та сприяють їх агрегації з подальшим осадженням або відокремленням від водної фази. У результаті такого впливу

відбувається зниження концентрації завислих і колоїдних частинок, а також часткове видалення розчинених речовин [64].

Крім вилучення забруднювачів, фізико-хімічні методи дозволяють змінювати фізичні та хімічні властивості стічних вод. Зокрема, за допомогою процесів нейтралізації можна регулювати показник рН, а використання окиснювачів сприяє руйнуванню токсичних органічних сполук та їх перетворенню на менш небезпечні продукти. Це особливо важливо для біотехнологічних виробництв, де стічні води можуть містити залишки поживних середовищ, метаболіти мікроорганізмів і різноманітні допоміжні речовини.

До найбільш поширених фізико-хімічних методів очищення належать коагуляція, флокуляція, сорбція, окиснення, екстракція, іонний обмін та флотація. Коагуляція забезпечує укрупнення дрібнодисперсних частинок із подальшим їх осадженням, сорбційні методи дозволяють видаляти органічні забруднювачі за допомогою активованого вугілля або інших сорбентів, а процеси окиснення сприяють руйнуванню складних органічних сполук [65, 66].

5.2.3 Біологічні методи усунення забруднень

Біологічне очищення є одним із найефективніших способів видалення органічних забруднень зі стічних вод, що утворюються під час виробництва ферментного препарату β -глюканази. Цей метод ґрунтується на здатності мікроорганізмів використовувати органічні речовини як джерело енергії та поживних компонентів, перетворюючи їх на простіші та екологічно безпечні сполуки. У процесі біологічного очищення відбувається мінералізація органічних забруднювачів, а також зниження вмісту сполук азоту та фосфору. [67].

Залежно від умов перебігу процесу розрізняють аеробні та анаеробні методи очищення. В аеробних системах життєдіяльність мікроорганізмів відбувається за наявності розчиненого кисню, який використовується для окиснення органічних речовин. До найпоширеніших аеробних споруд належать

біофільтри та аеротенки. Біофільтри являють собою установки, заповнені зернистим завантаженням, поверхня якого вкрита біологічною плівкою з мікроорганізмів. Під час проходження стічної води через шар завантаження органічні речовини окиснюються та частково мінералізуються.

Аеротенки є резервуарами, у яких очищення здійснюється за участю активного мулу — комплексу бактерій, найпростіших та інших мікроорганізмів. У процесі аерації створюються сприятливі умови для розвитку мікробіоценозу, який забезпечує інтенсивне розкладання органічних забруднювачів. Важливу роль відіграють також інфузорії, амеби, коловертки та інші найпростіші організми, які підтримують стабільність активного мулу шляхом споживання надлишкової бактеріальної маси.

Анаеробне очищення здійснюється без доступу кисню та базується на діяльності анаеробних мікроорганізмів. У результаті розкладання органічних речовин утворюється біогаз, основними компонентами якого є метан і діоксид вуглецю. Однією з головних переваг анаеробних технологій є можливість одержання енергетично цінного продукту — метану, який може бути використаний для покриття частини енергетичних потреб підприємства. Крім того, такі системи характеризуються низьким утворенням надлишкового мулу та меншими витратами електроенергії порівняно з аеробними процесами.

Для стічних вод біотехнологічних виробництв, які містять високі концентрації органічних речовин, анаеробне очищення часто є більш доцільним. Водночас для досягнення високого ступеня очищення на практиці нерідко застосовують комбіновані схеми, що поєднують анаеробні та аеробні стадії обробки [68].

5.2.4 Заходи щодо зменшення негативного впливу виробництва ферментів на організм людини

З метою мінімізації негативного впливу біологічних агентів, що утворюються в процесі виробництва ферментного препарату β -глюканази, необхідно впроваджувати комплекс організаційних, технічних і медико-профілактичних заходів, спрямованих на забезпечення безпеки працівників.

До технологічних заходів належить автоматизація та механізація виробничих процесів, застосування дистанційного керування обладнанням, а також герметизація апаратів і ємностей. Це дозволяє значно знизити рівень безпосереднього контакту персоналу з мікробіологічними культурами та зменшити ризик аерозольного забруднення робочої зони [69].

Важливе значення мають санітарно-технічні заходи, зокрема облаштування ефективної системи вентиляції. Використання місцевих витяжних установок та відсмоктувачів забезпечує локальне видалення біоаерозолів безпосередньо в зоні їх утворення, що сприяє зниженню концентрації мікроорганізмів у повітрі виробничих приміщень.

До медико-профілактичних заходів відносять регулярні попередні та періодичні медичні огляди персоналу, контроль стану здоров'я працівників, а також заходи, спрямовані на підвищення загальної резистентності організму. За необхідності можуть застосовуватися інгаляційні процедури та інші профілактичні методи, що сприяють зниженню ризику захворювань дихальної системи [70].

Особливу увагу слід приділяти використанню засобів індивідуального захисту. Для захисту органів дихання застосовують фільтрувальні та ізолювальні респіратори або протигази, для захисту очей — захисні окуляри, а для шкірних покривів — спеціальний виробничий одяг та рукавички. Використання засобів індивідуального захисту є обов'язковою умовою безпечної роботи у виробництві ферментних препаратів.

Дослідження показують, що мікробіологічний склад повітря виробничих приміщень має суттєве значення для оцінки санітарно-гігієнічних умов праці. Потрапляння аерозольних частинок мікроорганізмів до дихальних шляхів може призводити до їх осідання на слизових оболонках, колонізації та розвитку токсико-алергічних реакцій. Вираженість патологічних проявів залежить від концентрації біоаерозолів, тривалості експозиції, індивідуальної чутливості організму та стану імунної системи.

Сучасні дослідження підтверджують, що негативний вплив біологічних факторів обумовлений не лише цілісними клітинами та спорами мікроорганізмів, але й дрібнодисперсними клітинними фрагментами. Частинки аерозолію розміром менше 2,5 мкм здатні проникати у глибокі відділи дихальної системи та викликати імунологічні реакції. Встановлено, що ультрадисперсні частинки можуть значно переважати за кількістю спори мікроорганізмів, однак їх виявлення ускладнене через обмеженість традиційних методів аналізу біоаерозолів.

Біологічні агенти виробничого середовища можуть спричиняти розвиток алергічних захворювань, а в осіб із імунодефіцитними станами — інфекційні ураження. Основними шляхами надходження мікроорганізмів до організму є органи дихання та шлунково-кишковий тракт [70].

РОЗДІЛ 6

РОЗРАХУНОК ЕКОНОМІЧНОЇ ДОЦІЛЬНОСТІ ОБГРУНТУВАННЯ ВПРОВАДЖЕННЯ УДОСКОНАЛЕНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА β -ГЛЮКАНАЗИ

6.1 Техніко-економічне обґрунтування впровадження удосконаленої технології виробництва ферментного препарату β -глюканази

β -глюканаза належить до групи промислових ферментів, які широко застосовуються у: кормовій промисловості; пивоварінні; виробництві біоетанолу; харчовій промисловості; целюлозно-паперовій галузі. Найбільшу частку світового споживання β -глюканази (понад 60–70 %) становить кормова галузь, де фермент використовується для підвищення перетравності кормів на основі ячменю, жита та вівса.

Використання β -глюканази в кормовій промисловості обумовлене необхідністю підвищення поживної цінності кормів та покращення продуктивності тварин. Завдяки β -глюканазі можна збільшувати частку ячменю, вівса та інших зернових із високим вмістом некрохмальних полісахаридів у рецептурах кормів. Це дозволяє знижувати собівартість комбікормів без втрати їх поживної цінності. Застосування β -глюканази в кормовій промисловості є технологічно та економічно обґрунтованим, оскільки фермент усуває антипоживну дію β -глюканів, підвищує засвоюваність поживних речовин, покращує продуктивність тварин і птиці, дозволяє використовувати дешевшу зернову сировину та знижує собівартість виробництва продукції тваринництва. Саме тому β -глюканаза належить до найбільш поширених ферментних добавок у сучасному виробництві комбікормів

Світовий ринок кормових ферментів демонструє стабільне зростання завдяки: збільшенню виробництва м'яса та комбікормів; забороні кормових антибіотиків у багатьох країнах; розвитку біотехнологій; прагненню знизити витрати на відгодівлю тварин і т.ін.

Основними виробниками β -глюканази є:

- Novonesis (Данія);
- IFF (підрозділ Danisco Animal Nutrition - США);
- DSM-Firmenich (Нідерланди);
- AB Vista (Великобританія);
- Adisseo (Франція);
- BASF (Німеччина);

Основними світовими ринками споживання є: Китай, США, Бразилія; країни Європейського Союзу, Індія. За оцінками галузевих аналітиків, світовий ринок кормових ферментів зростає в середньому на 6–8 % щорічно, а сегмент β -глюканази залишається одним із найдинамічніших завдяки поширенню комбікормів із високим вмістом зернових культур.

Україна є одним із найбільших виробників зернових культур у Європі та має значний потенціал споживання кормових ферментів. Основними споживачами β -глюканази є: комбікормові заводи, птахофабрики, свинокомплекси; виробники преміксів і. т. ін. Серед особливостей українського ринку є висока залежність від імпорту, зростання попиту (через подорожчання кормової сировини виробники зацікавлені у підвищенні конверсії корму, що стимулює використання ферментів), а також наявність наукової бази. Вітчизняні наукові установи мають значний досвід у галузі мікробіології та біотехнології ферментів, що створює передумови для організації власного виробництва. Власне виробництво β -глюканази дозволить: знизити валютні витрати; забезпечити стабільність постачання; зменшити собівартість комбікормів; створити продукцію для експорту іт. ін.

Мета економічної частини дипломного проекту: Метою економічної частини є обґрунтування доцільності удосконаленої технології виробництва β -глюканази у промислове виробництво, оцінка економічної ефективності проєкту, визначення періоду окупності інвестицій, а також зробити висновки щодо інвестиційної привабливості проєкту.

Завдання:

- Розрахунок інвестицій у проєкт виробництва пробіотика.
- Розрахунок виробничої програми.
- Розрахунок чисельності працюючих на підприємстві.
- Розрахунок собівартості і ціни виробленої продукції.
- Розрахунок прибутку.
- Розрахунок терміну окупності інвестицій у проєкт та характеристика його загальної ефективності.

Об'єкт дослідження: є процес впровадження удосконаленої технології виробництва β -глюканази у промислове виробництво.

Предмет дослідження: економічні аспекти удосконалення технології виробництва β -глюканази, зокрема реалізація проєкту на діючому виробництві, покращення якості та зниження собівартості досліджуваного препарату.

Перспективи розвитку виробництва

Отже, світовий ринок β -глюканази характеризується стійким зростанням, обумовленим розвитком тваринництва та комбікормової промисловості. В Україні попит на β -глюканазу також зростає, проте ринок значною мірою залежить від імпорتنих препаратів. До основних факторів росту ринку β -глюканази в Україні належать: відновлення та розвиток тваринництва; модернізація комбікормових підприємств; впровадження сучасних ферментних технологій; розвиток біотехнологічного виробництва; збільшення експорту кормових добавок до країн Східної Європи та Азії. Тому, створення або модернізація вітчизняного виробництва β -глюканази є перспективним напрямом, який може забезпечити імпортозаміщення, підвищення конкурентоспроможності кормової галузі та вихід на міжнародні ринки.

6.2 Розрахунок інвестицій у проєкт виробництва ферментного препарату β -глюканази

У загальному вигляді суму інвестицій (І) визначають за формулою:

$$I = I_{\text{БУД}} + I_{\text{РЕК}} + V_{\text{УСТ}} + T + M + H + V_{\text{ЗАЛ}} + Д - Л + \Delta ОА, \quad (6.2.1)$$

$I_{\text{РЕК}}$ – витрати на реконструкцію виробничих потужностей;

$V_{\text{УСТ}}$ – вартість придбання технологічного обладнання;

T – транспортні витрати, пов'язані з доставкою обладнання (5 % від вартості придбання обладнання);

M – вартість монтажу устаткування (10 %) від вартості придбання устаткування);

H – невраховані витрати (2 % від вартості придбання устаткування, тис. грн.);

$V_{\text{ЗАЛ}}$ – залишкова вартість демонтованого обладнання, тис. грн. Залишкова вартість демонтується обладнання: якщо обладнання має 100% знос, то вона дорівнює 0, якщо немає, то враховується в капітальні вкладення, як недоамортизована вартість в розмірі відсотка зносу, який залишився;

$Д$ – вартість демонтажу, тис. грн. (5 % від первісної вартості демонтованого устаткування);

$Л$ – ліквідаційна вартість демонтованого устаткування. Якщо обладнання, що демонтується продається або здається на брухт, то ліквідаційна вартість розраховується, з урахуванням сплати податку на прибуток від продажу.

$\Delta ОА$ – приріст власних обігових активів, тис. грн.

Джерелами фінансування можуть бути як власні кошти підприємства (фонд розвитку та амортизаційні відрахування), так і участь у грантових проектах (проекти Horizon Europe, EU4Business і інші проекти). Таке грантове фінансування підходить для консорціумів (університет та підприємство), що важливо і актуально для потужної наукової біотехнологічної школи в ОНТУ.

Перелік технологічного обладнання та його вартість представлені в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1 - Перелік необхідного технологічного обладнання

Обладнання	Кількість	Ціна за 1 од. (тис. грн)	Сума (тис. грн)
Збірник-змішувач	1	550	550
Фільтр для поживного	1	400	400

середовища			
Насоси	6	180	1080
Стерилізатор	1	1200	1200
Теплообмінники	2	650	1300
Інокулятор	2	350	700
Посівний апарат	2	300	600
Ферментер	2	2500	5000
Фільтр для повітря	1	250	250
Повітродувка	2	300	600
Розпилювальна сушарка	1	1850	1850
Дозатор	2	300	600
Маркувальна машина	1	230	220
Інше додаткове обладнання	-	-	1500
Транспортні витрати	-	-	400
Монтаж устаткування	-	-	700
Всього	-	-	16950

Інвестиції на впровадження удосконаленої технології у виробництво та промислове випробування становитимуть 1888 тис. грн

Приріст оборотних активів становитиме:

$$\Delta OA = C_{заг} * k, \quad (6.2.2)$$

де $C_{заг}$ – загальна собівартість готової продукції;

k – частка обігових активів (%).

Частка матеріальних витрат у собівартості продукції становить 60-80%. Проте, для пускової партії планованого обсягу продукції достатньо 40 – 60% на покупку необхідних обігових активів, з урахуванням сучасної логістики приймаємо 50%:

$$\Delta OA = 26985 * 0,5 = 13493 \text{ тис. грн.}$$

Розрахуємо інвестиції у проект з виробництва пробіотика:

$$I = 16950 + 1888 + 13493 = 32331 \text{ тис. грн.}$$

6.3 Розрахунок виробничої програми

Коефіцієнт використання виробничої потужності розраховують за формулою:

$$K_{ВП} = OV_{річ} / ВП \quad (6.3.1)$$

$$K_{ВП} = 85 / 90 = 0,94$$

де $OV_{річ}$ – річний обсяг виробництва продукції, т

ВП – річна виробнича потужність, т

Запланований обсяг виробництва ферментного препарату β -глюканази на досліджуваному підприємстві становитиме 85 тонн на рік. Кількість робочих днів за рік за проектом Φ_{ef} становитиме 308 днів.

6.4 Розрахунок чисельності працівників (основні, допоміжні, управлінський персонал)

Загальне збільшення чисельності працюючих на підприємстві в разі впровадження проекту складається з суми робочих, керівників і фахівців (біотехнологів, операторів ферментерів, лаборантів і т. ін).

Чисельність працюючих на підприємства (Ч) розраховується за формулою:

$$\text{Ч} = \text{Ч}_{\text{роб}} + \text{Ч}_{\text{ауп}}, \quad (6.4.1)$$

$$\text{Ч} = 18 + 2 = 20 \text{ осіб}$$

де $\text{Ч}_{\text{роб}}$ – чисельність робітників підприємства (основних і допоміжних);

Чисельність основних робітників планується з технологічної частини дипломного проекту (щодо розстановки на лінії). Отже, додаткова чисельність основних працівників становитиме – 14 осіб. Допоміжних (30% від основних) = 4 особи. $\text{Ч}_{\text{ауп}}$ – чисельність адміністративно-управлінського персоналу (керівники і фахівці) - 2 особи. Загальна кількість додаткового персоналу для виробництва становитиме 20 осіб.

6.5 Розрахунок собівартості виробництва ферментного препарату β -глюканази

Складемо калькуляцію на річний проектний випуск продукції у обсязі 85 тонн. Вартість основних матеріалів для виробничого середовища визначимо виходячи з їх відсоткового співвідношення за представленими даними у технологічному розділі кваліфікаційної роботи бакалавра та їх цінами.

Вартість основних матеріалів – поживного середовища для культивування *Trichoderma reesei* штам 4 (соєве борошно, вівсяне борошно, калій фосфорнокислий K_2HPO_4 , сірчаноокислий амоній $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, кальцій хлористий CaCl_2 , для поживного середовища МКЦ для культур (*Lactobacillus*

plantarum, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus reuter*, Твін 80- полісорбат із урахуванням норм їх витрат та логістики становитиме 10900 тис. грн.

Вартість допоміжних матеріалів разом з транспортно-заготівельними витратами становитиме: $26500 \text{ тис. грн} * 0,05 = 1250 \text{ тис. грн}$.

Отже, загальна вартість основних та допоміжних сировини і матеріалів на весь обсяг продукції становитиме $10900 + 1250 = 12150 \text{ тис. грн}$.

Витрати за статтею «Паливо і енергія на технологічні потреби» наведено у таблиці 6.2.

Таблиця 6.2 - Вартість «Паливо і енергія на технологічні потреби»

Найменування	Одиниця вимірювання	Обсяг споживання	Ціна, грн/од. ресурсу	Загальна вартість, тис. грн
Електроенергія	кВт/год	306	6,54	2001,2
Вода холодна	м ³	8,53	35,16	300
Вода гаряча	м ³	3,8	105	400
Пара	м ³	2,8	144	398,8
Всього	-	-	-	3100

Витрати за статтями «Основна та додаткова заробітна плата» та «Відрахування на соціальні потреби» розраховуємо наступним чином:

Виходячи з розстановки по лінії, у нас було заплановано 14 основних робітників та 4 допоміжних, а також 2 фахівці.

$\text{Возп} = 18000 * 20 = 3600 \text{ тис. грн}$ (середня запланована заробітна плата додаткового персоналу становитиме 18000 грн/місяць, що відповідає даним фінансової звітності аналогічних підприємств).

$\text{Восн} = 3600 \text{ тис. грн}$.

Витрати за статтею «Додаткова заробітна плата» складають 10% від основної:

$\text{Вдзп} = 3600 * 0,2 = 360 \text{ тис. грн}$.

Витрати за статтею «Відрахування на соціальні заходи» складають 22% від суми основної і додаткової заробітної плати:

$\text{Всз} = (3600 + 360) * 0,22 = 871 \text{ тис. грн}$.

Розраховуємо витрати за статтею «Витрати на утримання і експлуатацію обладнання».

До витрат входять витрати утримання, амортизація, поточний ремонт обладнання та інструменту, утримання і ремонту обладнання, відшкодування зносу, інші затрати, котрі пов'язані з утриманням та експлуатацією обладнання. За даними фінансової звітності аналогічних суб'єктів господарювання їх норматив складає 31,2 тис. грн./тонну. Отже: $85 \cdot 31,2 = 2650$ тис. грн. на весь обсяг.

Розрахуємо витрати за статтею «Загальновиробничі витрати», за даними досліджуваного підприємства, вони орієнтовно становлять 21,2 тис. грн./тонна або 1800 тис. грн на весь обсяг.

Виробнича собівартість (Свироб) на весь запланований обсяг продукції буде дорівнювати сумі вищеперерахованих статей калькуляції (тис. грн.), а саме: $\text{Свироб} = 10900 + 1250 + 3100 + 3600 + 360 + 871 + 2650 + 1800 = 24531$ тис. грн.

Витрати за статтею «Адміністративні витрати», становлять 17 тис. грн./тонна або 1450 тис. грн. на весь обсяг. Інші операційні витрати становитимуть 2,2 тис. грн/тонну або 184 тис. грн на весь обсяг виробництва біопрепарату.

Розрахуємо витрати за статтею «Витрати на рекламу та збут», які плануємо у розмірі 9,7 тис. грн/тонну або 820 тис. грн. на весь обсяг (85 тонн).

Повну собівартість розраховуємо за наступною формулою:

$$\text{Сповна} = \text{С вироб} + \text{Ав} + \text{Взб} + \text{Він}, \text{ де} \dots \dots \dots (6.5.1)$$

Ав – амортизаційні відрахування, тис. грн.;

Взб – витрати на збут, тис. грн.;

Він – інші операційні витрати, тис. грн.

$$\text{С повна} = 24531 + 1450 + 184 + 820 = 26985 \text{ тис. грн.}$$

Повна собівартість річного проектного випуску продукції у обсязі 85 тонн препарату у вигляді порошку узагальнимо у вигляді таблиці 6.3.

Таблиця 6.3 - Повна собівартість річного випуску препарату (85 тонн)

Статті витрат	Собівартість, тис. грн.
1. Сировина і основні матеріали	10900
2. Допоміжні матеріали	1250

3. Паливо і енергія на технологічні цілі	3100
4. Основна заробітна плата виробничих робітників	3600
5. Додаткова заробітна плата виробничих робітників	360
6. Відрахування на соціальні потреби (22% осн+дод. з.п.)	871
7. Витрати на утримання та експлуатацію обладнання	2650
8. Загальновиробничі витрати	1800
Виробнича собівартість	24531
9. Адміністративні витрати	1450
10. Витрати на збут	820
11. Інші операційні витрати	184
Повна собівартість	26985

Дану структуру собівартості представимо графічно у вигляді рис. 6.1.

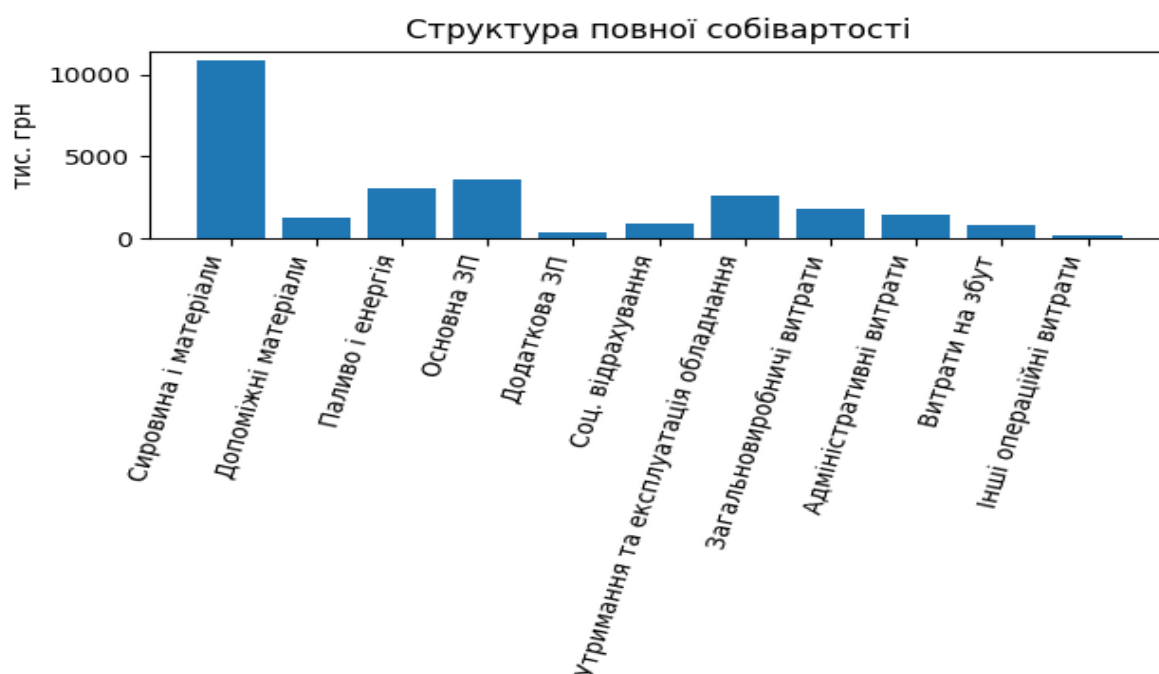


Рис. 6.1 Структура собівартості виробництва ферментного препарату β -глюканази

Виходячи з даних розрахунку загального річного обсягу виробництва, собівартість 1 кг ферментного препарату становитиме (26085 тис. грн / 85000 кг=318 грн за 1 кг).

Собівартість всієї виробленої продукції за формулою:

$$C_{\text{ЗАГ}} = \text{ОВ} * C_{\text{ОД}}, \quad (6.5.2)$$

де ОВ – обсяг виробництва певного виду продукції;

$C_{\text{ОД}}$ – собівартість одиниці певного виду продукції (318 грн/1 кг ферментного препарату β -глюканази).

Ціна одиниці продукції ($\Pi_{\text{ОД}}$) розраховується за формулою:

$$\Pi_{\text{ОД}} = C_{\text{ОД}} * (1 + P / 100), \quad (6.5.3)$$

Визначимо рівень рентабельності, виходячи із середньогалузевих показників фармацевтичного ринку для ферментів такого типу, який становить 30%.

Обсяг виробленої продукції в діючих цінах розраховується за формулою:

$$\text{ОВ} = \Pi_{\text{ОД}} * \text{ОВ}.$$

$$\text{ОВ} = 450 * 85000 = 38250 \text{ тис. грн}$$

6.6 Розрахунок прибутку та чистого прибутку

Прибуток (Π) розраховується за формулою:

$$\Pi = \text{ОВ} - C_{\text{ЗАГ}}, \quad (6.6.1)$$

де Π – прибуток за рік, тис. грн.;

ОВ – обсяг виробленої продукції, тис. грн.;

$C_{\text{ЗАГ}}$ – собівартість виробленої продукції, тис. грн.

$$\text{Отже, } \Pi = 38250 - 26985 = 11265 \text{ тис. грн.}$$

Чистий прибуток, що залишається в розпорядженні підприємства (ЧП), визначають за формулою:

$$\text{ЧП} = \Pi - \Pi_{\text{П}} \quad (6.6.2)$$

$$\text{ЧП} = 11265 - 2027,7 = 9237,3 \text{ тис. грн.}$$

де $\Pi_{\text{П}}$ – податок на прибуток (нині ставка податку на прибуток становить – 18 %). $\Pi_{\text{П}} = 11265 * 0,18 = 2027,7 \text{ тис. грн.}$

6.7 Розрахунок терміну окупності інвестицій

Термін окупності інвестицій розраховується за формулою:

$$T_{\text{ОК}} = I / \text{ЧП}, \quad (6.7.1)$$

$$T_{\text{ОК}} = 32331 / 9237,3 = 3,5 \text{ роки.}$$

Основні техніко – економічні показники запропонованого проєкту узагальнимо у вигляді таблиці 6.4.

Таблиця 6.4 - Основні техніко – економічні показники інвестиційного проекту виробництва ферментного препарату β -глюканази

Найменування показників	Значення показників
1. Виробнича потужність, тонн	85
2.Обсяг виробленої продукції, тонн	85
3.Обсяг виробленої продукції, тис. грн.	38250
4. Собівартість виробленої продукції, тис. грн.	26985
5. Прибуток, тис. грн.	11265
6. Чистий прибуток, тис. грн.	9337,3
7. Чисельність працюючих, осіб.	20
8. Середньорічний виробіток одного працівника, тис. грн./особу	1912,5
9. Інвестиції, тис. грн.	32331
10. Строк окупності інвестицій, роки	3,5

Висновки

Розглянутий інвестиційний проект виробництва ферментного препарату β -глюканази є економічно доцільним і може бути реалізований у промислових умовах. Виробнича потужність підприємства становить 85 тонн на рік, це означає, що обладнання використовується майже повністю, без значних простоїв. Фінансові результати проекту є позитивними. Обсяг виробленої продукції становить 38250 тис. грн на рік. Собівартість дорівнює 26985 тис. грн. У результаті підприємство отримує прибуток у розмірі 11265 тис. грн, а чистий прибуток становитиме 9337,3 тис. грн. Це показує, що виробництво є досить рентабельним. Також проект має високу продуктивність праці. Один працівник у середньому створює продукції на 1912,5 тис. грн на рік. Це досягається завдяки невеликій чисельності персоналу та використанню сучасного обладнання.

Загальний обсяг інвестицій становить 32331 тис. грн. Строк окупності проекту - 3,5 роки. Для біотехнологічного виробництва це є цілком прийнятним показником. Впровадження зазначеного виробництва в Україні має важливе значення. Зараз значна частина ферментних препаратів імпортується з інших

країн. Власне виробництво β -глюканази дозволить зменшити залежність від імпорту та зробити продукцію більш доступною за ціною для українських підприємств у галузях агропродовольчої сфери.

Крім того, розвиток такого виробництва сприяє розвитку біотехнологічної галузі в Україні, створює нові робочі місця та підтримує розвиток сучасної промисловості. У підсумку, слід відзначити, що проект є економічно вигідним і має важливе значення для використання наукового потенціалу ОНТУ та розвитку аграрного та біотехнологічного секторів економіки України.

ВИСНОВКИ

1. На основі розрахунків та статистичних даних обґрунтовано потребу у ферментному препараті бета-глюканази. Потреба у такому препараті для виробників ПАТ «Абінбев Ефес Україна» при виготовленні певних найменувань пива становить близько 85 тон на рік.
2. На основі скринінгу особливостей культивування найбільш поширених мікроорганізмів-продуцентів бета-глюканази обрано культуру продуцент – *Trichoderma reesei* штам 4.
3. Запропоновано співвідношення основних субстратів - індукторів у поживному середовищі соєвого борошна та вівсяного борошна - 2:1 - оптимальне для культивування *Trichoderma reesei*.
4. Доведена економічна доцільність впровадження. Термін окупності запропонованих удосконалень технології отримання ферментного препарату бета-глюканази складає – 3,5 роки.
5. Запропоновано очищення ферменту за допомогою ультрафільтрації, що максимально зберігає активність ферментного препарату.
6. У проекті передбачено всі необхідні вимоги щодо охорони праці та охорони навколишнього середовища.

Список використаних джерел

1. Новіков В., Сидоров Ю., Швед О. Тенденції розвитку комерційної біотехнології // Вісн. НАН України.– 2008. –№ 2. –С. 25–39.
2. Півоваров О.А., Ковальова О.С., Кошулько В.С. Інноваційні технології та обладнання бродильних виробництв: Навчальний посібник. – Дніпро: ФОП Обдимко О.С., 2025. 396 с.
3. Бомко В.С., Сиваченко Є.В., Сметаніна О. В. Корми і кормові добавки та ефективність їх використання в годівлі тварин: навч. посібник. – Біла Церква, 2023. – 225с.
4. Odabasi, Z., et al. (2004). *β -Glucan as a target for diagnosis and immunotherapy of invasive fungal infections*. Medical Mycology. (p. 62-65).
5. Adams, E. L., et al. (2008). *Differential high-affinity interaction of Dectin-1 with β -1,3-glucans of varying molecular weights*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. (p. 49-52).
6. Balasubramanian, A., et al. (2012). *Fungal β -glucanases and their implications in biotechnology and medicine*. Applied Microbiology and Biotechnology. (p. 38-47).
7. Duo-Chuan, L. (2006). *Review of Fungal β -Glucanases*. Mycopathologia. (p. 25-37).
8. Vizhi V.K. Study on Estimation, Extraction and Analysis of Barley Beta-glucan /V.K. Vizhi, J.N. Many// International Journal of Science and Research, 2012. - Vol. 358(3). - p. 1480-1484
9. Havrlentova, M., Petrulakova, Z., Burgarova, A., Gago, F., Hlinkova, A. and Sturdik, E. (2011). Cereal β -Glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods – A Review. Czech Journal of Food Science, 29(1): 1-14.
10. Гуменюк О.Л. Харчова хімія: лекцій для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» / Чернігів: ЧДТУ, 2013. – 244с.

11. Gebler J., Gilkes N.R., Claeyssens M., Wilson D.B., Beguin P., Wakarchuk W.W., Kilburn D.G., Miller R.C., Warren R.A.J., Withers S.G. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267. N 18. – P. 12559–12561.,
12. Henrissat B., Callebaut I., Fabrega S., Lehn P., Mornon J.P., Davies G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – Vol. 92. N 15. – P. 7090–7094
13. Klinmung, K., et al. (2020). "Marine carrageenases: A review on structure, function, and application." *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1850-1863.
14. Jiang, X., et al. (2021). "Production, purification and characterization of a novel k-carrageenase from *Pseudoalteromonas* sp." *Journal of Applied Phycology*.
15. He, Y., et al. (2022). "Advances in the production of carrageenanoligosaccharides by enzymatic degradation." *Marine Drugs*, 20(8), 478.
16. Pauly, M., et al. (1999). "A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme." *Glycobiology*, 9(1), 93-100.
17. Gloster, T. M., et al. (2007). "Structural Evidence for the Evolution of Xyloglucanase Activity from Non-specific Endo-1,4-beta-glucanases." *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 19177-19189.
18. Grishutin, S. G., et al. (2004). "Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1670(3), 243-251.
19. Abraham A., Narayanan S.P., Philip S., Nair D.G., Chandrasekharan A., Kochupurackal J. In silico characterization of a novel beta-1,3-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* – a bacterial endophyte of *Hevea brasiliensis* antagonistic to *Phytophthora meadii* // *Journal of Molecular Modeling*. – 2013. – Vol. 19. N 3. – P. 999– 1007.

20. Abraham A., Narayanan S.P., Philip S., Nair D.G., Chandrasekharan A., Kochupurackal J. In silico characterization of a novel beta-1,3-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* – a bacterial endophyte of *Hevea brasiliensis* antagonistic to *Phytophthora meadii* // *Journal of Molecular Modeling*. – 2013. – Vol. 19. N 3. – P. 999–1007
21. Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3(9): 853–859.
22. Martin K., McDougall B.M., McIlroy S., Chen J., Seviour R.J. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal beta-(1,3)- and beta-(1,6)-glucanases // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 31. N 2. – P. 168–192.
23. Fontaine T., Hartland R.P., Beauvais A., Diaquin M., Latge J.P. Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Aspergillus fumigatus* // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – Vol. 243. N 1–2. – P. 315–321.
24. Pitson S.M., Seviour R.J., McDougall B.M., Woodward J.R., Stone B.A. Purification and characterization of three extracellular 1,3-beta-D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* // *Biochemical Journal*. – 1995. – Vol. 308 (Pt 3). – P. 733–741.
25. Hong MR, Kim YS, Joo AR, Lee JK, Kim YS, Oh DK. Purification and characterization of a thermostable beta-1,3-1,4-glucanase from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2009 Aug;19(8):818-22. PMID: 19734720.
26. Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., & Singh, D. (2000). Solid-state fermentation in biotechnology. *Current Science*, 77(1)
27. Rai, S., Mukherjee, A. K., & Mukhopadhyay, S. (2012). Solid state fermentation of *Aspergillus awamori* for the production of β -glucanase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10(1), 69-76.
28. Sheng, J., Maruyama, J., Kitajima, Y., Nishikawa, A., & Sugahara, Y. (2017). Production of beta-glucanase using recombinant yeast cells with high cell densities and high cell viability. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 343-348.

29. Liu, M., Wang, G., Wang, Q., & Zhang, B. (2019). Development of a high-yield β -glucanase producing strain by genetic engineering. *Microbial cell factories*, 18(1), 31.; Li, Y., Liang, Y., Ji, X., Jin, Z., Zhang, H., & Jiang, Z. (2019). Efficient expression of β -glucanase gene in *Bacillus amyloliquefaciens* and characterization of the recombinant enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 168-175.

30. <http://ukrpivo.com/obsyag-virobnitstva-piva-za-12-misyatsiv-2024-roku/>

31. Методичні вказівки до практичних робіт з дисципліни «Загальна технологія харчових виробництв» для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія». Модуль 2. Технологія бродильних виробництв. Технологія консервування плодів та овочів / Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ; [уклад.: Т. Ю. Коляда.]. - 2014. 37с. URL: <https://udhtu.edu.ua/wpcontent/uploads/2017/08/8f785dd867d7574e61b141151b325a69.pdf>

32. <https://epravda.com.ua/news/2024/10/31/721256/>

33. Векірчик, К. М. Мікробіологія з основами вірусології : підручник / К. М. Векірчик. — Київ : *Либідь*, 2001. — 311 с.

34. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с. (У розділах, присвячених культивуванню продуцентів ферментів, наведено часові характеристики біотехнологічного процесу: для бактерій — до 48 годин, для мікроскопічних грибів — від 72 до 120 годин через особливості розвитку міцелію).

35. Role of *Bacillus* Species in Food Industry: Advantages and Limitations. *PMC Food Sect.* 2024. Vol. 12. P. 102–115.

36. Маринченко В. О., Домарецький В. А., Шиян П. Л. Технологія спирту. — К.: Поділля, 2003. — 496 с. (У розділах про мікробіологію бродіння та шкідники бродильного виробництва детально описано, як дикі дріжджі псують органолептику напою летючими кислотами та вищими спиртами).

37. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с. (Описує конструювання рекомбінантних штамів дріжджів для експресії гідролаз, включаючи β -глюканази).
38. Yeasts in Food and Beverages / Amparo Querol, Graham H. Fleet. — Springer, 2006. (Spoilage Yeasts in Brewing and Distilling).
39. Домарецький В. А. Технологія солоду та пива : підручник. — К. : ІНКОС, 2011. — 527 с.
40. Martinez, D., et al. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26(5), 553-560.
41. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія : підручник / Т. П. Пирог. — К. : НУХТ, 2009. — С. 165–172.
42. Патент України на винахід № 84322. Спосіб отримання ферментного препарату карбогідраз мікробного походження / ПрАТ «Ензим» (Ладижин).
43. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія : підручник. — К. : НУХТ, 2009. — С. 170–175
44. Білай В. Й. Основи загальної мікології. — К. : Вища школа, 1989. — 392 с.
45. Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2357-2372.
46. Войчук, С. І., Корецька, Н. В. Мікробіологія: Практикум / за ред. Т. П. Пирог. — К.: НУХТ. 2018
47. Леонтьєв Д. В., Акулов О. Ю. Загальна мікологія : підручник для вищих навчальних закладів. Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2007, 406 с.
48. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Мікробіологія : підручник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2016, 386 с.
49. Костіков І. Ю., Джаган В. В., Демченко Е. М. та ін. Ботаніка. Водорості та гриби : навчальний посібник. Київ : Арістей, 2006, 476 с.

50. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Мікробіологія : підручник. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2016, 386 с.
51. Леонтьєв Д. В., Акулов О. Ю. Загальна мікологія : підручник для вищих навчальних закладів. Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2007, 406 с.
52. Danielson R. M. and Davey C. B. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* // *Soil Biol. Biochem.* – 1973. - Vol. 5, pp. 505-515
53. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009
54. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Фізіологія мікроорганізмів. — Львів: ЛНУ ім. Івана Франка
55. Waites M. J., Morgan N. L., Rockey J. S., Highton G. *Industrial Microbiology: An Introduction*. – Oxford : Blackwell Science, 2013. – 288 p.
56. Закон України «Про охорону праці» № 2694-ХІІ від 14.10.1992 р.
57. Закон України «Про охорону навколишнього природного середовища» № 1264-ХІІ від 25.06.1991 р.
58. Закон України «Про охорону навколишнього природного середовища» № 1264-ХІІ від 25.06.1991 р.
59. Водний кодекс України № 213/95-ВР від 06.06.1995 р.
60. Який метод очищення стічних вод необхідно застосовувати на підприємстві [Електронний ресурс] // *Ecolog-ua.com*. – Режим доступу :<https://ecolog-ua.com/news/yakyy-metod-ochyshchennya-stichnyh-vod-neobhidno-zastosovuvaty-na-pidpryyemstvi>
61. Т. С. Айрапетян; Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2021. – 120 с.
62. Фізико-хімічні методи очищення стічних вод : навчальний посібник / за ред. А. К. Запольського. – Київ : Лібра, 2000. – 552 с.
63. Швед О.В .Екологічна біотехнологія: навч. Посібник: у 2кн./О.В.Швед, Р.О.Петріна,О.З. Комаровська – Порохнявець, В П Новіков. – Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2018. 368 с. Арк. КРБ.БМтаФХ.1.565-03. І.4 125

64. Юрій Тарас. Від чого залежить промислова могутність України? Всьому свій час, або біотехнології., 2014 Українське юридичне товариство URL: <http://justice.org.ua/politika-i-pravo-podiji-fakti-komentari/vid-chogozalezhit-promislova-mogutnist-ukrajini-vsomu-svij-chas-abo-biotekhnologii>.

65. Eimer D. Gas Treating: Absorption Theory and Practice. – Chichester : Wiley, 2014. – 440 p.

66. Степаненко О. М., Рейтер Л. Г., Ледовських В. М., Іванов С. В. Загальна та неорганічна хімія : у 2-х ч. – К. : Педагогічна преса, 2000.

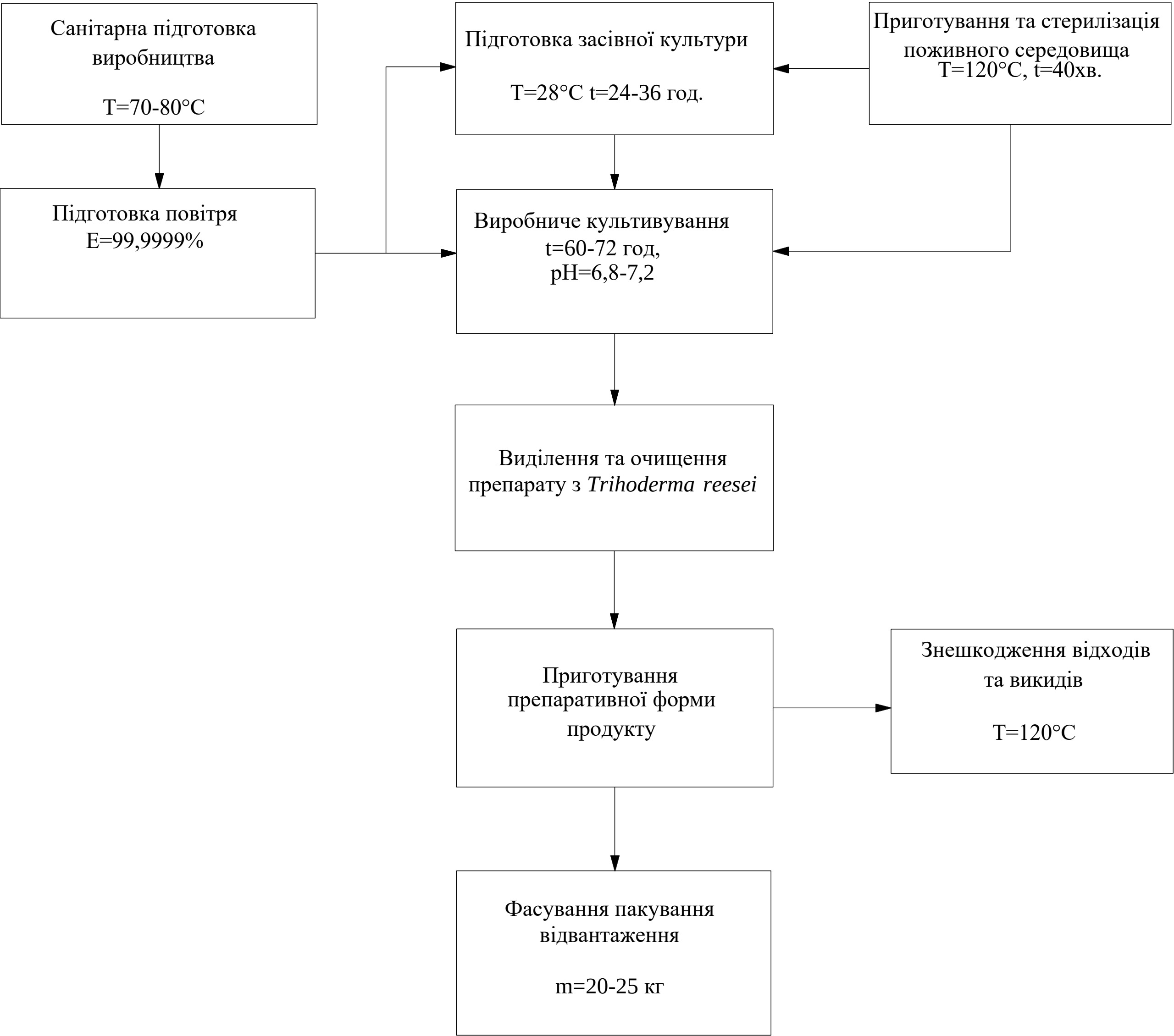
67. Юрій Тарас. Від чого залежить промислова могутність України? Всьому свій час, або біотехнології., 2014 Українське юридичне товариство URL: <http://justice.org.ua/politika-i-pravo-podiji-fakti-komentari/vid-chogozalezhit-promislova-mogutnist-ukrajini-vsomu-svij-chas-abo-biotekhnologii>.

68. Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. *Bioreaction Engineering Principles*. – 3rd ed. – New York : Springer, 2017. – 548 p.

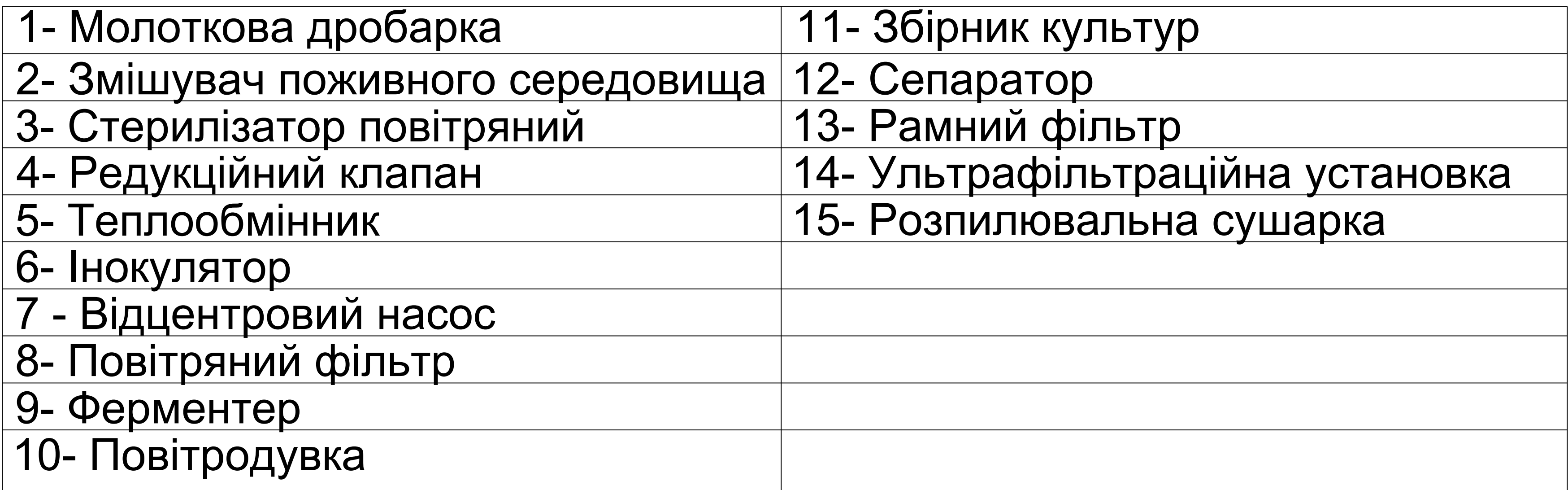
71. Барановський, Є., Ворона, Н. і Козак, О. (2025) ПРАКТИКА ОПТИМІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА ПРЕМІКСІВ І КОМБІКОРМІВ, *Scientific Works*, 89(2), pp 112-120. doi: 10.15673/swonaft.v89i2.3413.

72. Макаринська А. В. Еволюція біологічно активних речовин і способів збагачення комбікормової продукції. Одеса, 2015. 145 с. URL: <https://card-file.ontu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/a661cd3e-d22a-4a8e-a22b35160668e3b7/content>.

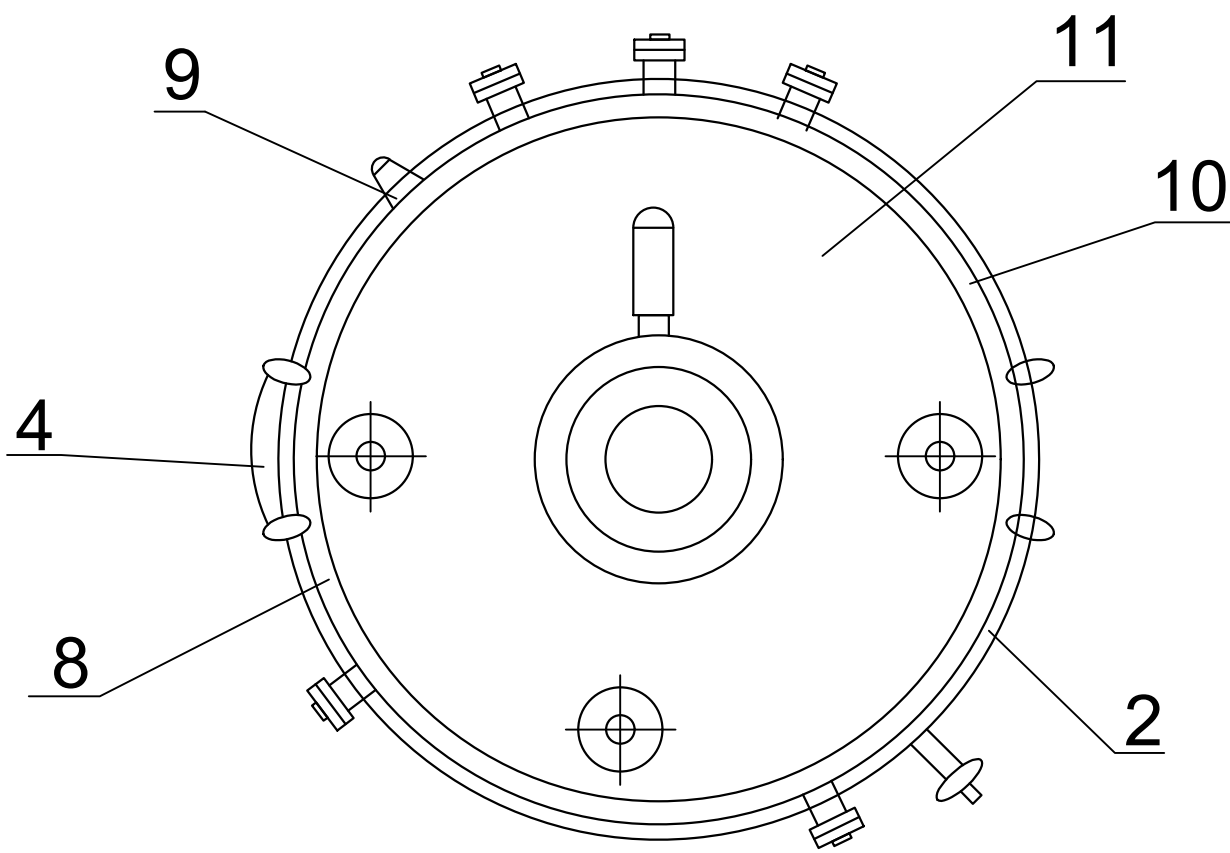
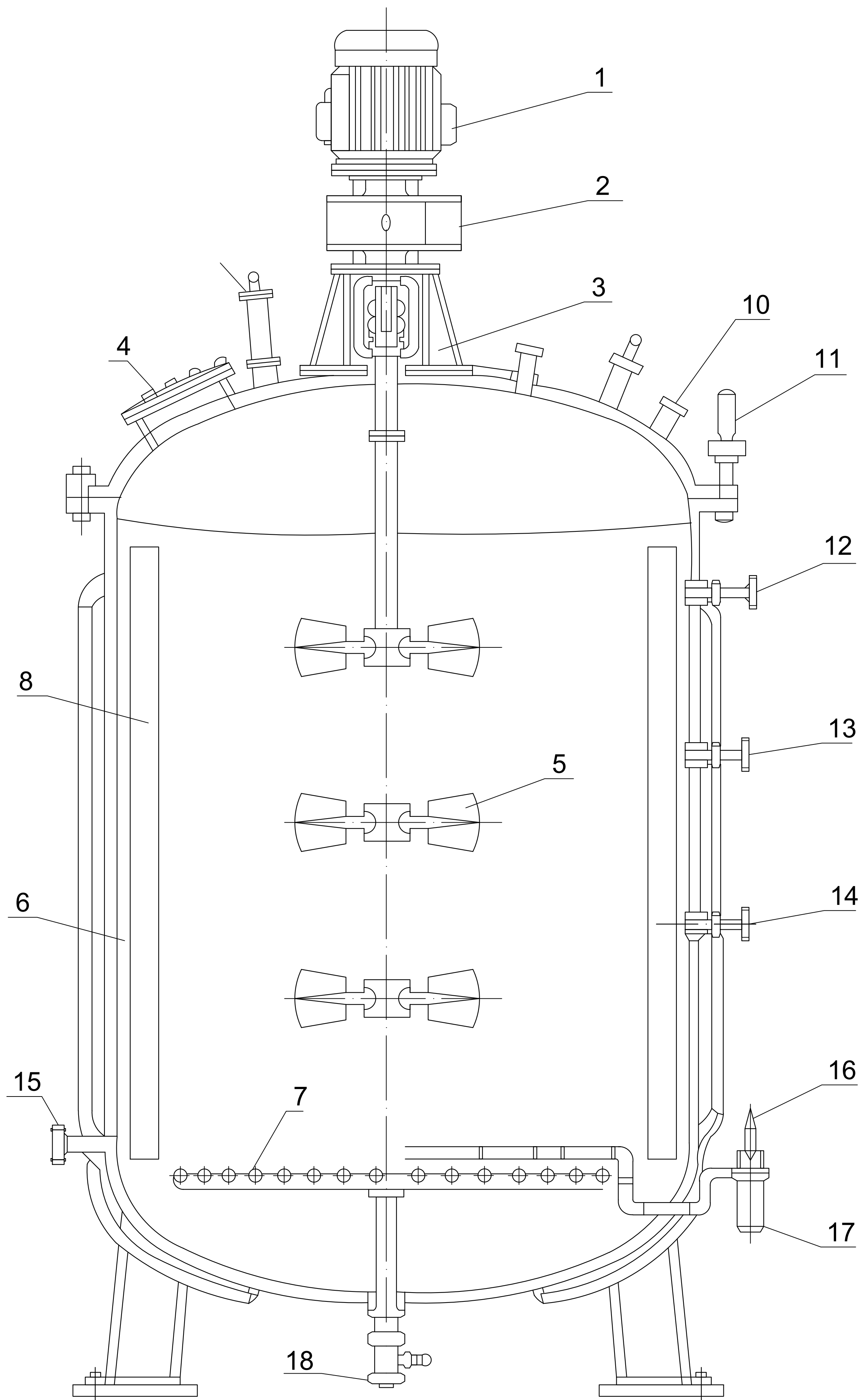
Принципова поетапна технологічна схема отримання β– глюканази



						Біотехнології та біоінженерія					
						КРБ.ХХЕ та Б.1.543.03.1.1					
Зм.	Арк.	Лист	Недок.	Підпис	Дата	Удосконалення технології ферментного препарату бета-глюканату			Літ.	Арк.	Аркуші
Розроб.		Курлич В.		Підпис Ю.						1	4
Керівник		Каньчиш О.М.		Підпис Ю.		Принципова поетапна технологічна схема отримання В- глюканази			ОНТУ - 2026		
Зав.каф.		Капустян А.І.		Підпис Ю.							



						Біотехнології та біонженерія				
						КРБ.ХХЕ та Б. 1.543.03.1.1				
Зм	Арк.	Лист	Вводк.	Підпис	Дата	Удосконалення технології ферментного препарату бета-глоканату		Літ.	Арк.	Аркуші
Розроб.	Курлич	В.								2
Керівник	Кананишкіна О.М.					Апаратурна схема отримання В-глоканазу		ОНТУ - 2026		
Зав. каф.	Калусян А.І.									



ФЕРМЕНТЕР 100 м³ (у розрізі)

№	Найменування
1	Електродвигун
2	Редуктор
3	Вал мішалки
4	Люк для обслуговування
5	Турбінна мішалка (4 яруси)
6	Відбивні перегородки (бафли)
7	Барботер (розподільник повітря)
8	Датчик температури
9	Подача поживного середовища
10	Патрубок для внесення посівного матеріалу
11	Патрубок для регулювання рН
12	Датчик розчинного кисню (DO)
13	Вхід охолоджуючої води в сорочку
14	Вихід охолоджуючої води із сороски
15	Пробовідбірник
16	Подача стерильного повітря
17	Повітряний фільтр
18	Вихід культуральної рідини (злив)

ТЕХНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА	
Робочий об'єм	100 м ³
Повний об'єм	110-120 м ³
Діаметр апарата	≈4000 мм
Висота апарата	≈13 500 мм
Матеріал	Нержавіюча сталь AISI 316L
Робоча температура	28-37°C
Робочий тиск	0,05-0,15 МПа
Аерація	0,5-1,5 vvm
Тип процесу	Глибинне аеробне культивування
Перемішування	Механічне

						Біотехнології та біоінженерія			
						КРБ.ХХЕ та Б.1.543.03.1.1			
Зм	Арк.	Лист	Нодок.	Підпис	Дата	Удосконалення технології ферментного препарату бета-глоканату			
Розроб.	Курич В.								
Керівник	Кавчишин О.М.					Схема ферментеру			
Зав.каф.	Капустян А.І.								
						Літ.			
						Арк.			
						Аркушів			
						3			
						4			
						ОНТУ - 2026			

ЗВЕДЕНІ РЕЗУЛЬТАТИ ЕКОНОМІЧНИХ РОЗРАХУНКІВ

Найменування показників	Значення показників
1.Виробнича потужність, тонн	85
2. Обсяг виробленої продукції, тонн	85
3. Обсяг виробленої продукції, тис.грн.	38250
4. Собівартість виробленої продукції, тис. грн.	26985
5. Прибуток, тис. грн.	11265
6. Чистий прибуток, тис. грн.	9337,3
7. чисельність праюючих, осіб	20
8. Середньорічний виробіток одного працівника, тис. грн.особу	1912,5
9. Інвестиції тис.грн	32331
10. Термін окупності інвестицій, роки	3,5

					Біотехнології та біоінженерія					
					КРБ.ХХЕ та Б.1.543.03.1.1					
Зм	Арк.	Лист	Недок.	Підпис	Дата	Удосконалення технології ферментного препарату бета-глюканату		Літ.	Арк.	Аркуші
Розроб.				Курлич В.						4
Керівник		Кананикіна О.М.				Зведені результати економічних розрахунків		ОНТУ - 2026		
Зав.каф.		Капустян А.І.								