

Міністерство освіти і науки України
Одеський національний технологічний університет
Кафедра Біохімії, мікробіології, та фізіології харчування



ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА ДО ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

на тему: **Отримання гідролітичного ферментного препарату з
 α -галактозидазною активністю**

Здобувача (ки) Ніколаїци В.Р.
(прізвище, ініціали)

5 курсу Біо₃-51 групи

Керівник доц., к.т.н. Петросьянц А.П.
(посада, прізвище, ініціали)

Консультанти: доц., к.т.н. Крупіна С.В.
(посада, прізвище, ініціали)

доц., к.т.н. Зиков О.В.
(посада, прізвище, ініціали)

Дипломний проєкт допускається до захисту

Рішення кафедри від 31 травня 2023 р., протокол №. 11
Завідувач(ка) кафедри БМ та ФХ Леонід Капрельянц
(назва кафедри) (підпис) (Ім'я, прізвище)

Одеса – 2023 рік

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет	Технології вина та туристичного бізнесу
Кафедра	Біохімії, мікробіології та фізіології харчування
Ступінь вищої освіти	Бакалавр
Спеціальність	162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма	Біотехнології та біоінженерія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Зав. кафедри БМ та ФХ _____

Капрельянц Л.В.

«____» _____ 2023 р.

ЗАВДАННЯ НА ДИПЛОМНИЙ ПРОЄКТ ЗДОБУВАЧА

Ніколаїци Валерії Русланівни

1. Тема роботи : Отримання гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю

Затверджена наказом академії від 06.12.2022 наказ 565-03

2. Термін здачі здобувачем закінченої роботи 01.06.2023

3. Вихідні дані роботи

Асортимент: фермент α -галактозίδαза , продуктивність 300 кг в рік, фасування у металеві банки 1кг

4. Перелік питань, які потрібно розробити

Анотація. Техніко-економічне обґрунтування проєкту. Наукова частина. Огляд літературних джерел за темою проєкту. Технологічна частина проєкту. Економічна частина проєкту. Охорона праці та навколишнього середовища. Висновки. Перелік джерел посилання. Додатки.

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

4 листів. Лист 1 –Технологічна схема виробництва α -галактозίδαзи ; Лист 2 - Апаратурно-технологічна схема виробництва α -галактозίδαзи ; Лист 3 - Монтажний лист (ферментер); Лист 4 – Схема сушильної установки

Продовження додатка 2

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

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Технологічна частина	к.т.н.доц., Петросьянц А.П.	23.02.2023	06.06.2023
Економічна частина	к.е.н.доц., Крупіна С.В.	23.03.2023	19.04.2023
Інженерно-технічне забезпечення	к.т.н.доц., Килимечук О.О.	23.04.2023	15.05.2023

7. Дата видачі завдання 03.02.2023

Керівник

Петросьянц А.П.

Завдання прийняла до виконання

Ніколаїца В.Р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Анотація. Техніко-економічне обґрунтування отримання α -галактозидози	24.02.23-14.03.23	Виконала
2.	Наукова частина. Огляд літературних джерел за темою проєкту.	24.02.23-14.03.23	Виконала
3.	Технологічна частина. Технологічна схема. Опис технологічних процесів.	15.03.23-04.04.23	Виконала
4.	Схема постадійного контролю. Вимоги до якості готової продукції	05.04.23-24.04.23	Виконала
5.	Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс.	05.04.23-24.04.23	Виконала
6.	Економічна частина. Розрахунок економічної ефективності проєкту. Розрахунок виробничої програми.	05.04.23-24.04.23	Виконала
7.	Інженерно-технічна забезпечення	26.04.23-25.05.23	Виконала
8.	Охорона праці та навколишнього середовища	26.04.23-25.05.23	Виконала
9.	Перелік джерел посилання. Додатки	26.04.23-25.05.23	Виконала
10.	Оформлення РПЗ	26.05.23-30.05.23	Виконала

Здобувач – дипломник _____ Ніколаїца Валерія Русланівна

Керівник роботи _____ Петросьянц Арсен Педросович

Несу відповідальність за ідентичність електронного та друкованого варіанту 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 доброчесності.

Здобувач _____ Ніколаїца В.Р

ЗМІСТ

Анотація	4
Вступ	7
1. Огляд літературних джерел за темою проєкту	9
1.1. Характеристика хімічного складу соєвих продуктів	9
1.2 Ферменти - основні агенти біотехнологічних процесів	10
1.3 Біотехнологічні основи використання ферментів під час переробки рослинної сировини	11
1.4 Застосування ферментних препаратів у харчовій промисловості	12
1.5 Загальна характеристика ферментів класу гідролаз	16
1.6 Ферменти, що гідролізують галактоолігосахариди соє продуктів	18
1.7 Біотехнологічні прийоми переробки сої в харчові продукти	19
2. Біотехнологічні основи отримання α-галактозидози	21
2.1 Мікроорганізми джерела α -галактозидаз	21
2.2 Хімізм процесів біохімічного розщеплення субстратів під дією α -галактозидози	25
3. Технологічна частина	28
3.1 Технологічна схема	28
3.2 Опис технологічних процесів	29
3.3 Схема постадійного контролю біосинтезу α -галактозидози	33
3.4 Вимоги до якості готової продукції	35
3.5 Інженерно-технічне забезпечення проєкту	35
3.6 Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс біосинтезу α -галактозидози	50
4. Економічна частина	61
4.1 Розрахунок економічної ефективності проєкту	63
5. Охорона праці та навколишнього середовища	71
5.1 Охорона праці	71
5.2 Охорона навколишнього середовища	74
Висновки	81
Перелік джерел посилання	82
Додатки	86
Додаток А - Технологічна схема виробництва α -галактозидози	87
Додаток Б - Апаратурно-технологічна схема виробництва α -галактозидози	88
Додаток В - Монтажний лист ферментер	89
Додаток Г – Схема сушильної установки	

				ДП.БіВ.1.998-03. І.4			
Посада	Прізвище	Підпис	Дата				
Студент	Ніколайца В.Р.			Отримання гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю	Літ.	Арк.	Акрушів
						3	93
Керівник	Петросьянц А.П.				Кафедра БМтаФх ОНТУ		
Зав. кафедрою	Капельянц Л.В.						

Анотація

Основними задачами роботи було: вивчення різних методів виділення, очищення, концентрування і сушіння ферментного препарату; визначення впливу різних фізико-хімічних показників на активність ферменту; ідентифікація функціонально каталітичних груп активного центра ферменту; механізм дії ферменту, дослідження процесу гідролізу соєпродуктів із використанням отриманого ферментного препарату; розробка принципово технологічної схеми виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

Мета проєкту – розробка лінії біосинтезу для виробництва α -галактозидازی на основі продуцента *Bifidobacterium longum*.

Завдання проєкту – розглянути біотехнологічні аспекти виробництва α -галактозидازی; запропонувати проєктні рішення лінії виробництва α -галактозидازی; визначити склад оптимального поживного середовищ для культивування культури *Bifidobacterium longum*; описати технологію виробництва.

Дипломний проєкт на тему «Отримання гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю» складається зі вступу, п'яти розділів, списку використаних джерел та додатків.

Розділі 1 огляд літературних джерел за темою проєкту.

Розділ 2 наведена наукова частина. Та розглянуті такі підрозділи: характеристика посівного матеріалу, характеристика поживних середовищ.

Розділ 3 присвячений технологічній частині дипломного проєкту. В ньому приведені технологічна схема та її опис, матеріальний баланс, схема по стадійного контролю біосинтезу α -галактозидازی. Також в цьому розділі наведене технологічне забезпечення технічного цеху та підбір і розрахунок основного технологічного обладнання.

Розділ 4 розроблена економічна частина проєкту, де розраховано прибуток, чистий прибуток, кількість необхідних інвестицій та строк окупності проєкту.

Розділ 5 охорона праці та навколишнього середовища спрямований на діяльність підприємства з очищених та шкідливих речовин стічних вод і газів, що викидаються у повітря, зниження норм використання природних ресурсів тощо.

Загальний обсяг роботи становить 93 сторінки з них 73 основного тексту, 23 таблиць, 8 рисунків, список використаних джерел який складається з 61 найменувань.

Ключові слова: продукт, культивування, дезінтеграція, α -галактозідозна активність, біфідобактерії, соєві галактоолігосахариди, біотехнологія.

ANNOTATION

The thesis is devoted to the development of the technology of hydrolysis enzyme with α -galactosidase activity.

Determination of the characteristic of *Bifidobacterium longum* culture, which can be both a starter culture and the source of the enzyme was done. Cultivation was carried out in the medium of MRS broth.

The aim of the project is to develop a biosynthesis line for the production of α -galactosidase based on *Bifidobacterium longum* the producer .

The task of the project is to consider biotechnological aspects of α -galactosidase production; propose design solutions for the α -galactosidase production line; determine the composition of the optimal nutrient medium for the cultivation of *Bifidobacterium longum*; describe the production technology.

The graduation project "Development of design solutions for the production of α -galactosidase based on *Bifidobacterium longum* " consists of an introduction, five chapters, a list of used sources and applications.

Section 1 review of literature sources on the topic of the project.

Section 2 presents the scientific part. The following subdivisions are considered: characteristics of sowing material, characteristics of nutrient media and preparation of nutrient medium.

Section 3 is devoted to the technological part of the diploma project. It presents the technological scheme and its description, material balance, the scheme of staged control of α -galactosidase biosynthesis. Also in this section the technological maintenance of technical shop and selection and calculation of the basic technological equipment is resulted.

Section 4 developed the economic part of the project, which calculates the profit, net profit, amount of required investments and payback period of the project.

Section 5 labor and environmental protection is aimed at the activities of the enterprise for treated and harmful substances of wastewater and gases emitted into the air, reducing the use of natural resources and more.

The total volume of the work is 93 pages, of which 73 are the main text, 23 tables, 8 figures, a list of sources used which consists of 61 items.

Key words: product, cultivation, desintegration, α -galactosidase activity, bifidobacterium, soy galactooligosaccharides, biotechnology.

ВСТУП

Одна з умов підтримання здоров'я, працездатності та довголіття людини - дотримання трьох основних принципів раціонального харчування: балансу енергії, задоволення потреби організму в певній кількості та співвідношенні харчових речовин, режиму харчування. Практичне застосування сучасних теорій харчування призвело до створення нового покоління, так званих, "здорових продуктів" або функціональних продуктів [1].

Тому перед усіма галузями харчової промисловості стоїть завдання виробництва продуктів, що забезпечують безпеку життєдіяльності організму; продуктів високої якості та з високими споживчими властивостями, тому що якість і асортимент визначають стан здоров'я населення [2].

Серед функціональних продуктів одне з важливих місць належить продуктам із сої. Нині в різних програмах харчування, що застосовуються в усьому світі, соєвим білкам віддають явну перевагу перед іншими видами білків. Мабуть, вони є єдиними білковими інгредієнтами, що мають велике промислове значення, які будуть застосовуватися в осяжному майбутньому як у харчових, так і у функціональних цілях як замітники традиційного м'ясного та молочного білка. Завдяки розвитку технології застосування соєвих інгредієнтів, стало можливим отримувати продукти, які можуть виконувати різні функції, такі як емульгування, зв'язування складових компонентів і текстурування [3].

Медико-біологічні випробування засвідчили, що споживання соєвих продуктів справляє позитивний ефект при лікуванні великої кількості захворювань різного характеру [4].

Біохімічний склад сої такий, що під час виробництва з її бобів продукції необхідні складні технологічні процеси і насамперед температурні впливи, спрямовані на інактивацію антипоживних речовин.

Застосування різних біотехнологічних методів дає змогу розробити нові дієтичні соєві продукти підвищеної біологічної цінності, які містять у собі всі поживні компоненти сої та позбавлені вуглеводних компонентів галактоолігосахаридної природи [5-6].

РОЗДІЛ 1

АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика хімічного складу соєвих продуктів

Соя - одна з найдавніших культурних рослин, яку людина використовує в їжу вже понад п'ять тисячоліть. Обробляти сою почали в Китаї, звідти вона поширилася на інші країни Сходу [7].

Перші результати дослідження соєвого харчування були опубліковані в 30-х роках нашого століття і стосувалися використання сої у хворих на анемію та

цукровий діабет [8]. Надалі, за допомогою соєвих дієт було отримано обнадійливі результати в разі захворювань печінки, нирок, остеопорозу, атеросклерозу, артеріальної гіпертонії, різноманітних неопластичних процесів та ін. [9]. До теперішнього часу в багатьох країнах світу склалися соєві промислові виробництва, що випускають текстурований білок, а також інші продукти із сої (масло, молоко, паста, маргарин, морозиво, шоколад та ін.) [10].

Одночасно із соєвих бобів було виділено і детально вивчено фітостероли, ізофлавонони, фітат, геністеїн, інгібітори протеаз, лецитин, алергени [11-12]. Це сприяло вивченню механізмів профілактичної та лікувальної дії окремих компонентів соєвих бобів за різних захворювань.

За результатами останніх досліджень соя - це ефективний засіб профілактики та лікування ракових, серцевих і ниркових захворювань, діабету, остеопорозу, жовчнокам'яної хвороби та підвищеного вмісту холестерину в крові [13].

Виробництву сої приділяється значна увага насамперед тому, що ця культура виробляє за період вегетації більше білка, ніж будь-яка інша рослина [14].

Таблиця 1.1 - Хімічний склад сортів сої районованих на півдні України

Сорт	Білки	Жири	Вуглеводи	Зола	Вологість
Аркадія	43,6± 2,5	18,2 ±0,4	24 ±0,85	4,5 ±0,07	9,98± 0,04
Пальміра	40,8± 1,05	18,9± 0,25	25,2± 1,8	5,0 ±0,10	10,1± 0,05
Успіх	37,8 ±1,5	19,7± 0,4	28,15± 0,56	4,2± 0,05	10,25± 0,03
92/95	39,6± 1,3	21,5 ±0,17	25± 1,1	4,35± 0,07	9,6±0,04

Загальновизнаним у цей час шляхом, що відображає нову політику в галузі раціоналізації білкового харчування населення і розглядається в усьому світі як найважливіший елемент як щодо ліквідації дефіциту білка в досить стислі строки, так і усунення його якісної неповноцінності та поліпшення харчової цінності харчових продуктів харчування, є використання нових джерел білка. Найперспективнішими з них, поряд із молочними, є соєві білки [15].

1.2. Ферменти - основні агенти біотехнологічних процесів

Біохімічні реакції протікають із великою швидкістю завдяки участі природних каталізаторів, які називаються ферментами. Високий ступінь специфічності та висока ефективність ферментів забезпечують строго визначені послідовності перетворення метаболітів [16-17].

На думку вчених, на зміну ері антибіотиків і гормональних препаратів приходить ера ферментів. Однак широке використання ферментів обмежене їхньою малою стабільністю під час зберігання, швидкою інактивацією під впливом внутрішніх середовищ організму, сильними імунологічними реакціями, високою вартістю і нездатністю до регенерації.

У наш час до перспективних напрямів ферментної технології належать використання термостабільних та іммобілізованих ферментів у промисловості [18-19].

1.3. Біотехнологічні основи використання ферментів під час переробки рослинної сировини

Під час переробки рослинної сировини в харчові продукти, корми, використовується ферментативний гідроліз. При цьому виникають завдання різного ступеня складності, що визначається видом і числом субстратів, що гідролізуються, їхньою локалізацією в сировині, агрегатним станом у гідролітичній системі, заданим ступенем розщеплення і складом продуктів гідролізу. Найпростішими є процеси гідролітичного розщеплення індивідуальних водорозчинних субстратів. З процесів цього типу в технології використовуються інверсія сахарози, гідроліз лактози, інших олігосахаридів, глікозидів. Найважливіші компоненти рослинної сировини - полісахариди, білки, ліпіди - представлені групами сполук, що мають спільні властивості, що дає змогу розглядати їх як субстрати відповідних ферментів [20-21].

У разі використання для гідролізу двох і більше ферментів їх у багатьох випадках вводять у реакційне середовище одночасно. Це виправдано за відсутності інгібування продуктами гідролізу, за прояву синергізму дії ферментів, а також за гідролізу кількох субстратів, локалізованих в одному виді сировини.

Проведення одностадійного гідролізу часто пов'язане з неможливістю розділити процес на стадії через відсутність препаратів, що мають переважну активність певних ферментів.

Послідовне застосування гідролітичних ферментів доцільне в разі гідролізу слабоподрібненої рослинної сировини. Під час гідролізу сильно подрібненої сировини можна знехтувати її початковою архітектонікою і

проводити одночасно гідроліз кількох субстратів або вибірково гідролізувати одні компоненти, не зачіпаючи інших.

Режим проведення гідролізу обирають відповідно до оптимальних умов дії використовуваних ферментів і меж зміни параметрів, припустимих у рамках конкретної технології. Так при отриманні гідролізатів рослинної сировини для мікробіологічної біоконверсії можна повністю дотримати оптимальні для ферментів умови температури, рН, середовища, ввести деякі мінеральні або органічні активатори чи стабілізатори, якщо необхідні.

Водночас технологія харчових продуктів, напоїв вводить певні обмеження на зміни складу сировини, її кислотності, температурного режиму обробки. Тому ферментативна активність може проявлятися повністю, що потрібно враховувати при розробці режимів ферментації харчової сировини [22-23].

1.4.Застосування ферментних препаратів у харчовій промисловості

Ферменти широко використовуються в народному господарстві. Так, у хлібопеченні застосовують ферментні препарати, які покращують якість і аромат хліба. Під час зберігання м'яса, фруктових соків, не пастеризованих пива і вина як антиокислювач використовується глюкозооксидаза. У шкіряному і хутряному виробництві застосовують препарати пептидогідролаз, що прискорюють розм'якшення шкір і видалення з них вовни в кілька разів.

Нині набули поширення два методи використання ферментів у технології харчових продуктів:

1. ферментів, що містяться в самій перероблюваній сировині;
2. ферментів, що вносяться в оброблюваний матеріал.

У харчовій промисловості ферменти використовуються у вигляді препаратів.

У технології харчових продуктів особливо велике значення карбогідраз і протеаз.

Технологічні операції та прийоми в отриманні продуктів харчування переважно визначаються дією цих ферментів; вони зумовлюють вихід і якість продукту [24].

Спиртова промисловість - під час виробництва спирту з крохмалистої сировини (картоплі, різних видів зерна) використовують ферментні препарати з амілолітичною, цитолітичною та протеолітичною активністю.

Пивоваріння - ферменти відіграють ключову роль на всіх етапах пивоваріння. Класична технологія пива ґрунтується на використанні ферментів ячмінного солоду та дріжджів сахароміцетів [25].

Виноробство - технологія промислової переробки винограду ґрунтується на регуляції процесів, що каталізуються ферментами сировини, її мікрофлори, культурних штамів дріжджів і бактерій-збудників бродіння. Поряд із цим використовуються промислові препарати гідролітичних ферментів, переважно цитолітичних і протеолітичних. Обробку ферментними препаратами застосовують на стадіях отримання соку, підготовки суслу до бродіння, стабілізації вин.

Спосіб застосування ферментних препаратів визначається якістю сировини і видом продукції, що виробляється.

Гідролітичне розщеплення структурних і розчинних біополімерів винограду знижує в'язкість матеріалу, полегшує процес виділення соку, запобігає колоїдному помутнінню [26].

Консервна промисловість - ферментні препарати з цитолітичною, пектолітичною і протеолітичною активністю застосовують під час вироблення соків, пюре, екстрактів, препаратів пектину зі свіжої плодово-ягідної сировини.

В основі технології всіх видів цукристих продуктів із крохмалю лежить регульована декстринізація (розрідження) клейстеризованого крохмалю. Як сировину зазвичай використовують кукурудзяний або картопляний крохмаль у вигляді водних суспензій концентрації 35-38 %.

Дрібні крохмальні гранули клейстеризуються при температурі вище 120 °С. Клейстеризацію-розрідження проводять в одну або три стадії, залежно від термостабільності застосовуваної α -амілази. За допомогою амілаз високої термостабільності, таких як Така-терм або Термаміл, клейстеризують крохмаль в одну стадію, при безперервному підвищенні температури до 105-110 °С. У присутності ферменту знижується верхній температурний поріг клейстеризації, оскільки структура гранул ослаблена частковим гідролізом. Одностадійне розрідження дає змогу зменшити витрату ферменту на одиницю субстрату в 3 рази.

Ферменти можуть впливати як на клейстеризований, так і на нативний крохмаль, проте в другому випадку реакція протікає значно повільніше. Тому в більшості технологічних процесів переробки крохмалевмісної сировини передбачена клейстеризація крохмалю.

Група ферментів, що гідролізують крохмаль (амілолітичних), включає: α -амілазу, β -амілазу, глюкоамілазу, α -глюкозидазу, ізоамілазу, пуллуланазу. Для розщеплення крохмалю використовують також циклодекстринглюканотрансферазу, що належить до класу трансфераз [27-28].

Гідроліз мальтози до глюкози може бути здійснений за допомогою амілолітичних ферментів (глюкоамілази, α -глюкозидази), як це відбувається під час одержання цукристих продуктів із крохмалю. Прикладом процесу, де мальтоза гідролізується як основний вуглеводний компонент, є зброджування пивного сусла. Гідроліз каталізує α -глюкозидаза, локалізована в клітинних стінках пивних дріжджів.

Необхідність гідролізу сахарози виникає під час приготування концентрованих цукрових сиропів, морозива, начинок для цукерок. Перетворення сахарози на суміш цукрів різної просторової конфігурації запобігає кристалізації цукру. Для гідролізу сахарози використовують β -фруктофуранозидазу, звану також інвертазою, сахаразою, фруктозидазою.

Гідроліз лактози проводять під час переробки продуктів рослинного походження спільно з молочною сировиною, як це має місце в хлібопеченні, кондитерській та безалкогольній промисловості. Для гідролізу лактози використовується фермент β -галактозидаза.

Препарати β -галактозидази виділяють із культур мікроорганізмів. Дріжджі та бактерії синтезують внутрішньоклітинний фермент високої молекулярної маси (200-600 кДа), що має субодиничну структуру. Оптимальний рН 6,9-7,2. Фермент втрачає активність за температури 40 °С (30-40 % за годину). Активатори ферменту - іони магнію та марганцю.

Гриби синтезують як внутрішньоклітинну так і позаклітинну форму β -галактозидази.

Усі β -галактозидази - кислі білки з ізоелектричною точкою при рН 4,4-5,1.

Грибна β -галактозидаза не тільки стабільніша, ніж дріжджова і бактеріальна, але має також ширшу субстратну специфічність, що пояснюється значною часткою фракції позаклітинного ферменту у грибів.

Вітчизняні препарати розчинної та іммобілізованої β -галактозидази отримують на основі культивування одного з видів *Pennicillium* [29-30].

1.5. Загальна характеристика ферментів класу гідролаз

Гідролази - ферменти, що каталізують реакції розщеплення речовин. Каталітична активність цих ферментів залежить від наявності в їхньому каталітичному центрі HS-груп. Ці ферменти розривають внутрішньо молекулярні зв'язки, за винятком С-С зв'язків, шляхом приєднання елементів води [31].

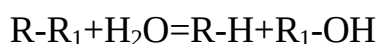
Гідролази поділяють на два типи за характером протікання процесу розщеплення субстрату.

Ендо-ферменти каталізують неупорядковане розщеплення внутрішньомолекулярних зв'язків полімерної молекули з утворенням у початковій стадії гідролізу великих фрагментів різної величини.

Екзо-ферменти каталізують послідовне відщеплення фрагментів рівної величини, найчастіше мономерів або димерів, від певного кінця полімерної молекули [32].

Оборотність гідролізу - гідролази каталізують як розщеплення субстрату, так і конденсацію продуктів реакції між собою або субстратом.

Інгібування гідролізу продуктами реакції - низькомолекулярні продукти гідролізу полімерів інгібують гідроліз. Ступінь інгібування тим вищий, чим вища спорідненість ферменту до продуктів реакції. Багато глікозидаз виявляють високу спорідненість до моносахаридів, що відщеплюються [33].



Розрізняють такі основні групи гідролаз:

Естерази - ферменти, що гідролізують складноєфірні зв'язки.

- а) Фосфотази - гідролізують складні ефіри фосфорної кислоти.
 - б) Карбоксіестерази - гідролізують складні ефіри органічних кислот.
 - в) Сульфоестерази - гідролізують складні ефіри сірчаної кислоти.
 - г) Тіоестерази - гідролізують складні ефіри органічних кислот і тіоспиртів.
- Глікозидази - ферменти, що розщеплюють глікозидні зв'язки у вуглеводах їхніх похідних.

До них належать α - і β - амілази, сахараза, мальтаза, лактаза тощо.

Пептидази - ферменти, що гідролізують пептидні зв'язки.

До них належать екзопептидази (послідовно розщеплюють кінцеві пептидні зв'язки в поліпептидному ланцюзі), ендопептидази (гідролізують внутрішні пептидні зв'язки в поліпептидному ланцюзі).

Амідази - це гідролази, що розщеплюють амідний зв'язок.

До них належать:

- а) пурин і піримідиндезамінази
- б) Ациламідази - гідролізують аміди кислот
- в) амідинази - відщеплюють амідинову групу з приєднанням до неї гідроксили води.

Поліфосфотази - ферменти, що гідролізують фосфорноангідридні зв'язки.

До них належать аденозитрифосфотаза, нулеозиддифосфотаза, нуклеотидпірофосфотаза тощо.

Існують й інші, менш важливі, групи гідролаз [90]. Гідролази широко поширені в природі й беруть участь в обміні вуглеводів, жирів, білків та інших сполук.

1.6. Ферменти, що гідролізують галактоолігосахариди соє продуктів

α -галактозίδαза є внутрішньоклітинним (ендо) ферментом. Як джерела α -галактозίδαзи використовують насіння гуара (*Cyamopsis tetragonolobus*), насіння *Cassia sericea*, грибів *Giberella fujikuroi*, *Mortierella vinacea*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Cladosporium cladosporioides*, емульсин (ферментний препарат, який отримують із мигдалю) [34].

Активність ферменту вимірюють за методом Church у цитратному буфері. Максимальна активність для даного ферменту виділеного з культури *Bifidobacterium longum* CRL 849 становить 8,5-9,0 од/мг.

Вплив катіонів та аніонів на активність α -галактозίδαзи - додавання Mn^{2+} до реакційного середовища збільшує активність ферменту на 22,4 %, у той час як Hg^{2+} є найсильнішим інгібітором ферменту. Додавання двовалентних катіонів, таких як Fe^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , до реакційного середовища не змінює ферментативну активність.

Дія іонів основного інгібітору Hg^{2+} на різні ферменти з α -алактозідазною активністю, виділених з різних джерел, свідчить про присутність толових груп у каталітичному центрі ферменту.

Активність α -галактозίδαзи не пригнічується в результаті дії желуючих агентів, таких як EDTA, цей факт говорить про те, що даний фермент не потребує присутності катіонів металів. Додавання β -меркаптоетанолу та р-хлормеркурійбензоату не діє на ферментативну активність, цей факт підтверджує відсутність сульфгідрильних груп в активному центрі ферменту.

Вплив рН на активність галактозидази. α -галактозидаза, що продукується *B.longum*, проявляла активність в інтервалі значень рН від 5,0 до 7,5, досягаючи максимуму за рН близького до 6,0 (рис. 3), що узгоджується з повідомленнями авторів, які вивчали активність цього ферменту в культурах біфідобактерій і лактобацил [35].

Вплив температури на активність α - галактозидази - температурний інтервал для прояву максимальної α -галактозидазної активності ферменту є доволі широким: від 33 до 48⁰ С, однак, за більш високої температури настає його інактивація.

Термостабільність α -галактозидазної активності. Дослідження активності ферменту за значень температури від 4 до 60 ⁰С і нагрівання протягом 40 хвилин показало, що порівняно з препаратами, описаними раніше [36], досліджувана нами α - галактозидаза не відрізняється високою термостабільністю. Наприклад, за температури 15 ⁰С за 40 хв. активність ферменту знижувалася на 22-24 %, а за 50 ⁰С за той самий час - на 73 %.

Властивості α -галактозидази з *Bifidobacterium longum* CRL 849 дозволяють використовувати цей мікроорганізм як стартерну культуру для продуктів із соєвого молока. Крім того, висока термостабільність ферменту дасть змогу тривати гідролізу олігосахаридів протягом періоду зберігання ферментованого продукту [37].

1.7. Біотехнологічні прийоми переробки сої в харчові продукти

Технології переробки цільних соєвих бобів можна розділити на 4 групи. До першої належать способи фракціонування, що дають змогу одержувати олію і шрот, який використовується в основному в кормо виробництві і лише 5 % якого піддається подальшій переробці для отримання знежиреного харчового соєвого борошна, концентратів та ізолятів соєвих білків [38]. До другої групи входять технології отримання соєвого молока і продуктів його

переробки, а також ферментованої соєвої продукції [39]. Третя група пов'язана з виробництвом цільножирного і напівжирного соєвого борошна та його модифікацій [40]. До четвертої належать методи отримання з цільного насіння заміників горіхів, проростків і соєвого соусу.

Поряд із технологією фракціонування, що дає можливість отримувати олію і білкові продукти із соєвого шроту, досить широко використовуються способи

переробки цільних соєвих бобів для вироблення продуктів як у промислових, так і в домашніх умовах. До цієї групи, так званої цільносоєвої продукції, входять: соєве молоко, тофу, окара, ююба, темпі, місо і натто.

У провідних країнах-виробниках сої також розвинене й виробництво продуктів харчування з неї, як-от, наприклад, неферментовані соєві продукти: соєве молоко, пінки соєвого молока, соєві сир "Тофу" свіжий, заморожений "Корі-тофу", висушений і смажений на фритюрі "Абураге", тостоване борошно. Ферментовані соєві продукти - це соєва паста "Місо", соєвий соус "Шою", соєвий сир "Соу-фу" і соєве пюре. Крім цих продуктів виробляють також соєве м'ясо, шоколад рідкий, йогурти, різні пекарські вироби. Перераховані продукти виробляються або повністю з сої, або у вигляді добавки в різні безалкогольні напої та продукти дитячого харчування [41].

Для шкільного, студентського та харчування військовослужбовців необхідні спеціальні види текстурованих білків. Добавки в кількості 1,3 % до маси хлібопекарських виробів збільшують поглинаючу здатність води і покращують розподіл повітряних пухирців та ін. [42]. Додавання соєвого борошна в кекси сприяє створенню рівної текстури та більш м'якої і ніжної скоринки. Додавання в солодкі вироби (2-4 %) підвищує повітроутримувальну здатність і характеристики розкочування тіста.

Використовується соєве борошно і для виробництва соєвого хрусткого печива та хлібців [43].

Соєві ізоляти вже використовують як відбілювачі для різних харчових продуктів, у молочних соусах і заморожених десертах, також для отримання соєвого масла (вершкового), різноманітних йогуртів, шоколаду та інших продуктів.

Для України необхідна національна програма підтримки виробників і переробників сої, яка була б розрахована на 8-10 років, тоді і фермери, і КСП, і орендні підприємства реально можуть взяти цю культуру на озброєнні для виробництва.

У технічному і технологічному плані розширення цієї культури в Україні потребуватиме розробки та виготовлення як окремих одиниць, так і комплектів обладнання, що цілком реально для наших численних цехів, дільниць і заводів, які простоюють від відсутності замовлень на виготовлення машинобудівної продукції [44].

Для отримання якісних сертифікованих продуктів необхідні технологічні регламенти виробництва, стандарти та сертифікати на соєві боби, олію, шрот та інші продукти, і в цьому разі продукція, що випускається, може бути конкурентно спроможною як на внутрішньому, так і на зовнішньому ринках соєвих продуктів [45-46].

РОЗДІЛ 2

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ОТРИМАННЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ

2.1. Мікроорганізми джерела α -галактозідаз

α -Галактозидази (α -D-галактозид галактогідролаза, КФ 3.2.1.22) - високоспецифічні глікозил-гідролази, основною каталітичною функцією яких є гідроліз α -галактозідних зв'язків із відщепленням нередукуючого залишку α -D-галактози.

Субстратами α -галактозидаз є мелібіоза, рафіноза, стахіоза, гліколіпіди та глікопротеїни, галактоманнани, лінійні та розгалужені галактоолігосахариди, що широко розповсюджені в рослин.

Завдяки численним можливостям практичного застосування в біотехнологіях і медицині α -галактозидази останнім часом привертають дедалі більше уваги дослідників [47]. Продуковані мікроорганізмами α -галактозидази, що продукуються мікроорганізмами, використовуються для деградації незасвоюваних галактозовмісних вуглеводів у процесах перероблення рослинних субстратів, поліпшення органолептичних властивостей харчових і кормових продуктів [48].

Молочнокислі бактерії та біфідобактерії - компоненти пробіотичних препаратів - також є джерелом α -галактозидаз [49]. У літературі повідомляється про використання лактобацил *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* і *Lactobacillus buchneri* з α -галактозидазною активністю для ферментації фруктів та овочів [49-50].

α -галактозидазам пробіотичних бактерій як симбіонтним мікроорганізмам шлунково-кишкового тракту належить важлива роль у метаболізмі складних важкозасвоюваних галактозовмісних полісахаридів рослинного походження. Особливо актуальним є дослідження ферментів, відсутніх або недостатньо розвинених у тварин і людини [51]. Мета дослідження - скринінг штамів з α -галактозидазною активністю серед біфідобактерій та молочнокислих бактерій

родів *Lactococcus*, *Leuconostoc* та *Lactobacillus*, а також дослідження особливостей продукції цього ферменту в молочнокислих та біфідобактерій.

2.1.1. Характеристика *Bifidobacterium*

Найбільш досліджуваними видами біфідобактерій є: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactentis*, *B. liberorum* тощо.

Біфідобактерії - це грампозитивні, анаеробні, безспоріві, нерухомі палички, (0,5-1,3) x (1,5-8) мкм. Біфідобактерії являють собою надзвичайно варіабельні за формою палички - прямі, вигнуті, розгалужені.

Серед штамів, виділених із кишківника дорослих людей, переважають паличкоподібні та булавоподібні форми: палички, які розгалужуються, частіше трапляються в дітей грудного віку. На ранніх стадіях розвитку переважають паличкоподібні форми, а під час подальшого культивування утворюються розгалужені нитки з численними перегородками і в основному стовбурі, і в відгалуженнях.

Форма клітин мікроба залежить від різних чинників: умов культивування, віку культури, зміни складу поживних середовищ, зміни рН середовища тощо. Незважаючи на те що низка авторів, описуючи морфологію біфідобактерій, були одностайні, зазначаючи їхній поліморфізм, то щодо причин, які його спричиняють, думки були суперечливими [52].

Усі види біфідобактерій за первинного виділення є суворими анаеробами. У присутності вуглекислого газу вони можуть бути толерантними до кисню. За лабораторного культивування ці мікроорганізми набувають здатності розвиватися в присутності деякої кількості кисню, а на високопоживних середовищах - рости в повністю аеробних умовах. Чутливість до кисню в багатьох штамів варіює, що зумовлено відмінностями в механізмі бродіння. Деякі види можуть рости в атмосфері повітря, збагаченого 10% CO₂. Оптимальною є температура (37-41)°C. Оптимальне значення рН (6-7), за рН нижче 4,5 і вище 8,5 ріст мікроорганізмів припиняється.

Біфідобактерії є хемоорганотрофами, активно зброджують сахарозу, галактозу, фруктозу, мелібіозу, рафінозу, лактозу тощо, з утворенням, здебільшого, оцтової та молочної кислот у молярному співвідношенні 3:2.

Утворюють також домішки мурашиної та бурштинової кислот, а також етанолу. Масляну, пропіонову кислоти та CO₂ не утворюють.

2.1.2. Характеристика *Lactobacillus*

Лактобактерії (*Lactobacillus*) - це рід молочнокислих бактерій, що налічує 130 різних видів. Лактобактерії - це грампозитивні облігатні або факультативні анаероби з високою ферментативною активністю. Багато видів лактобактерій входять до складу нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Найбільша кількість лактобактерій міститься в товстому відділі кишечника (10⁶-10⁷ КОЕ/г). Вони представлені головним чином *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. reuteri* і *L. rhamnosus*.

Лактобактерії становлять меншу частину мікрофлори кишечника, проте виконують не менш важливі метаболічні функції, ніж основний представник нормальної мікрофлори товстого кишечника - біфідобактерії. Лактобактерії пригнічують у кишківнику ріст гнильних і умовно-патогенних мікроорганізмів за рахунок здатності утворювати такі речовини, як молочна кислота, лізоцим, бактеріюцини (лактоцини В, F, J, M, лактобrevін, плантарицин та ін.).

Більшість представників роду мають форму прямих паличок із заокругленими кінцями, зібраних у ланцюжки різної довжини, або розташовані поодинокі чи попарно. Серед лактобацил трапляються короткі кокоподібні та звивисті форми, а також довгі, ниткоподібні палички завдовжки від 0.7-1.1 до 3.0-8.0 мкм, розташовані поодинокі або зібрані в ланцюжки. Так, вигнута форма клітин властива *L. curvatus*; у *L. coryniformis* клітини мають форму вигнутих грушоподібних паличок. Довжина паличок і величина вигину зазвичай залежать від умов росту: складу живильного середовища, температурного режиму, аерації, а також віку культури. У деяких видів (наприклад, *L. fermentum*, *L. brevis*) культура

завжди представлена сумішшю коротких і довгих паличок. Лактобацили не утворюють ендоспор. За Грамом забарвлюються позитивно, стають грамнегативними з віком і при підвищенні кислотності. Під час забарвлення за Грамом або метиленовим синім у деяких штамів виявляються біполярні тільця, зернистість або лінійна окресленість цитоплазми. Для деяких видів, наприклад, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* і *L. delbrueckii subsp. lactis*, характерна наявність включень зерен волютину (метахроматину, поліфосфатних гранул). Більшість лактобацил нерухомі. Рухливість спостерігається лише у представників деяких видів, а саме: *L. agilis*, *L. aquaticus*, *L. capillatus*, *L. ghanensis*, *L. mali*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. ruminis*, *L. satsumensis*, *L. sucicola*, *L. uvarum*, *L. vini*, при цьому вони пересуваються за допомогою перитрихіальних джгутиків. Цікаво відзначити, що переміщатися можуть не тільки окремі клітини, а й ланцюжки з 2-5 клітин. Рухливість значною мірою залежить від поживного середовища і віку культури; часто вона виявляється тільки під час виділення лактобацил і втрачається після кількох пересівів.

Лактобацили - хемоорганогетеротрофи. Дуже вимогливі до джерел живлення, потребують багатих складних середовищ. З вуглеводів вони переважно зброджують гексози (глюкозу, фруктозу, манозу, галактозу) і дисахариди (лактозу, мальтозу, сахарозу), і тільки гетероферментативні види, наприклад, деякі штами *L. plantarum*, зброджують пентози (рибозу, ксилозу, арабінозу).

2.2. Хімізм процесів біохімічного розщеплення субстратів під дією α -галактозидози

В уявленнях про механізм розщеплення глікозидних зв'язків карбогідразами виходять із принципу орієнтованої сполученої атаки електрофільних і нуклеофільних груп на глікозидний зв'язок оліго- і полісахаридів.

Оскільки рН-оптимум α - галактозідрази дорівнює 5,5-6,2, її карбоксильна група в активному каталітичному центрі перебуває у вигляді карбоксилат-іона, а імідазольна - у вигляді протонізованого імідазолію. Обидві функціональні групи в акті каталізу, як правило, беруть участь у вигляді спряженої системи, яка не тільки зв'язується з реагуючими групами субстрату (галактоолігосахариду), а й чинить сильну поляризуючу дію на ці групи. Саме такі властивості притаманні карбоксильній та імідазольній групам. Резонувальний гетероцикл імідазолу здатний діяти як донор або акцептор позитивних або негативних груп [53].

У каталітичному центрі α -галактозідрази, як і інших карбогідраз, пара карбоксилат-імідазол утворює систему карбоксилат-імідазолій, яка функціонує за типом кислотно-основного каталізу [54].

Під впливом системи карбоксилат-імідазолій у глікозидному зв'язку олігосахаридів відбувається стягування електронів до імідазолію та їхній відхід від карбоксилат-іона. Відзначається нерівномірна електронна щільність при C_1 і О-атомах у вуглеводі, оскільки ці атоми мають різну електронегативність. Кисневий атом має вищу електронну густину ніж C_1 атом вуглецю залишку α -галактозідрази. Нуклеофільна атака C_1 атома молекулою H_2O завершує розщеплення зв'язку α -1,6- між залишками галактозидрази в молекулі олігосахариду.

Передбачуваний механізм розриву α -1,6-глікозидного зв'язку узгоджується з роботами інших авторів, які вивчали процес розщеплення глікозидних зв'язків карбогідразами.

α -галактозідраза - є карбогідразою ендотипу, що звільняє галактозу з невідновлювального кінця ланцюга олігомерного субстрату. Вона здатна, вочевидь, каталізувати як гідроліз, так і трансглікозилювання, тобто обмінні реакції між глікозильними залишками і протонами води або акцептора. У цих реакціях галактоза звільняється як α -аномер і конфігурація аномерного

центру субстрату зберігається в продукті трансглікозилювання. Потрібно підкреслити, що спрямованість реакцій трансглікозилювання пов'язана з умовами проведення ферментативного каталізу, зокрема, з концентрацією субстрату в реакційному середовищі [55].

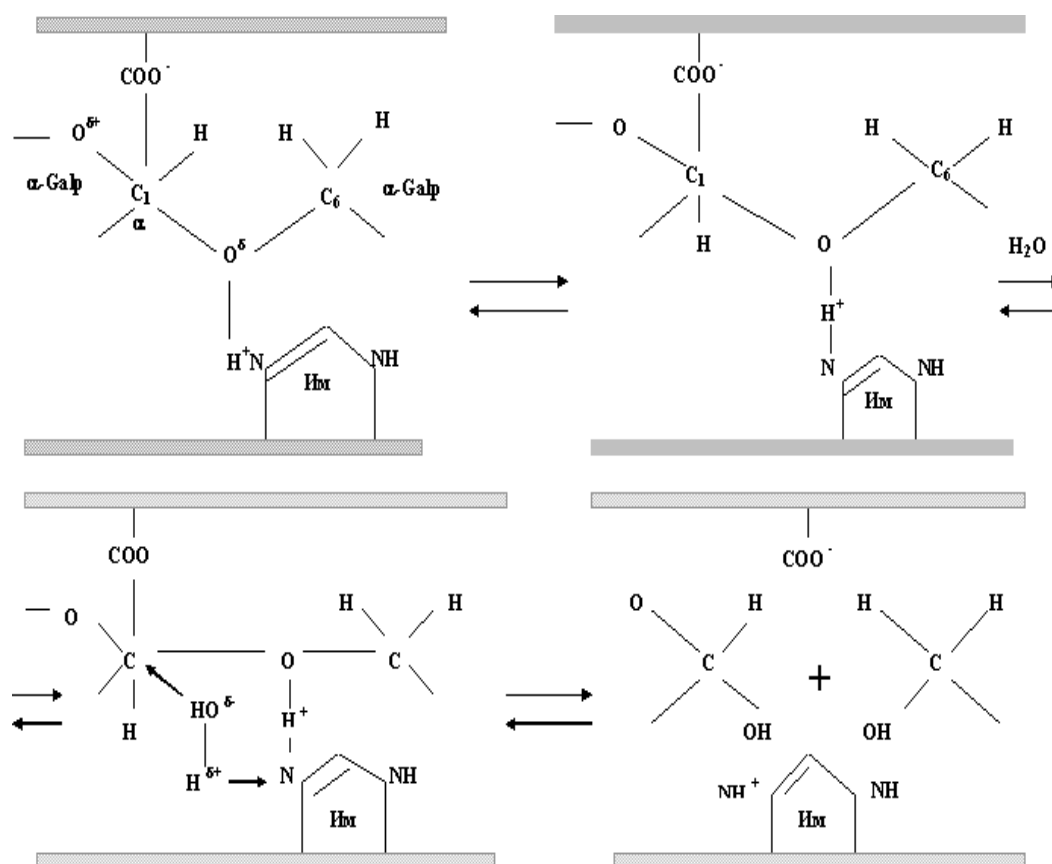


Рис.2.1 Механізм розриву α -1,6 глікозидного зв'язку в молекулі рафінози

РОЗДІЛ 3

ПРОЄКТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ГІДРОЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ ГАЛАКТОЛОНГІН Г10Х

3.1. Технологічна схема одержання гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х



**Рис. 3.1. Принципова технологічна схема одержання
гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.**

3.2 Опис технологічних процесів.

Виробництво гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х включає наступні основні технологічні стадії:

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу – спецодяг, засоби індивідуального захисту.

ДР 1.2 Підготовка приміщень – вологе прибирання та дезінфекція приміщень з застосуванням перекису водню (3%) та обладнання, приміщень мікробіологічної лабораторії бактерицидними лампами (2-3 год. щоденно). Обробка столів етиловим спиртом.

ДР 1.3. Підготовка обладнання. Миття миючим засобом обладнання. Обладнання для поживного середовища обробляють по чергово етиловим спиртом чи розчином перекису водню (температура 50-60°C).

Перевірка обладнання на герметичність – при тиску 0,05 мПа на протязі 30 хв. фланцеві з'єднання, зварні шви головного фільтру, ферментеру, посівного апарату перевіряють розчином мильної води при 0,05 мПа. Під тиском пари перевіряють всі вентиля та трубопроводи.

Стерилізація головного фільтру та комунікацій гострою парою (тиск 0,18-0,2 мПа, $T=130^{\circ}\text{C}$, 2 год.), продування до видалення вологості; індивідуальні фільтри стерилізують парою ($T=130^{\circ}\text{C}$, 1 год). Посівний апарат та ферментер стерилізують парою (тиск 0,18-0,2 МПа, $t^0=130^{\circ}\text{C}$, 1 год.)

ДР 1.4 приготування дезінфікуючих розчинів: 0,5% розчин для миття устаткування (5 мл миючого засобу, 995 мл води 40°C); Розчин перекису водню; Розчин етилового спирту (792 мл 96% спирту, 208 мл очищеної води)

ДР 2 Стерилізація аераційного повітря

Повітря для аерації середовища в інокуляторі повинно бути стерильним і мати температуру 28-30°C. Забір атмосферного повітря роблять через повітрозбірник (2 м. вище даху). Механічна очищення за допомогою пінополіуретану усуває частки більше 5 мкм. Поршневим компресором транспортують повітря, збільшуючи його температуру до 90-100°C.

Проходячи через теплообмінник з оборотною водою (тиск 0,3 МПа), повітря охолоджується до 30⁰С. В головному фільтрі (скловолокну діаметром 7-21 мкм) відбувається очистка повітря від пилу та мікроорганізмів. Заключна стерилізація повітря відбувається в індивідуальних фільтрах тонкої очистки (фторопластові втулки 4 мм) перед інокулятором та ферментером.

ДР 3. Стерилізація піногасника (л.2,поз.3)

В якості піногасника використовується стерилізована соєва олія, (при температурі 120 – 122 °С та тиску 0,12 МПа, 2 год.)

ДР 4. Підготовка стерильного поживного середовища

Розчин для титрування. Для доведення рН розчинів поживних середовищ до необхідного значення готують 6 %-ий розчин NaOH. У реактор (л.2,поз.7)

вносять 3 кг сухого гідроксиду натрію і доводять водопровідною водою до загального об'єму 50 л. Для доведення рН розчинів поживних середовищ до необхідного значення та культуральної рідини після ферментації до 4,5-5,0 готують 6 %-ий розчин HCl. У реактор (л.2,поз.4) вносять 3 л соляної кислоти концентрованої і доводять водопровідною водою до загального об'єму 50 л.

Вирощування чистої культури *Bifidobacterium Longum* здійснювали на середовищі середовищі MRS при 37 °С.

Поживне середовище MRS стерилізують в ферментері (л.2,поз.6) місткістю 1 м³ протягом 1 год при температурі 120⁰С.

Таблиця 3.1 – Робочий склад поживного середовища.

Назва	Кількість
М'ясний екстракт	0,2 г/л
Пептон з казеїну	0,2 г/л
Дріжджовий екстракт	0,1 г/л
Двузамінний фосфат калію	0,04 г/л
Цитрат амонію	0,04 г\л
D-глюкоза	0,4 г\л
Твін	0,02 г\л
Ацетат натрію	0,1 г\л
Сульфат магнію	0,004 г\л
Сульфат марганцю	0,001 г\л
Хлорид марганцю	0,0035 г\л

Стерильним розчином NaOH доводять рН отриманого середовища до 6,0, що є оптимальним для культивування штаму-продуцента *Bifidobacterium Longum* з метою максимального накопичення α -галактозидازی.

ДР 5 Вирощування посівного матеріалу (л.2,поз.6)

Посівний споровий матеріал (0,75-2%) пророщують протягом 24-год при 37 °С.

ДР 6 Виробнича ферментація (л.2,поз.6)

Виробничу культуру отримують глибинним способом в ферментері Р-8 (л.2,поз.6) об'ємом 1 м³, коефіцієнт заповнення 0,6. Після охолодження простерилізованого поживного середовища до температури 37 °С, вноситься отриманий посівний матеріал з інокулятора у кількості 1% від кількості поживного середовища для головної ферментації, яку здійснюють при 37 °С.

ДР 7 Очищення ферментного препарату Галактолонгін Г10х

Осідання ферменту з екстракту проводили етанолом або н-пропанолом при 4 °С. Для формування осаду суміш витримували 30 хвилин. Осад відділяли на рефрижераторній центрифугі та висушували ліофільно. Потім осад розчиняли у мінімальному об'ємі фосфатно-цитратного буфера (рН 4,5) та здійснювали висолювання сульфатом амонію при наповнюванні 55-56%.

Подальше очищення проводили гель-фільтрацією на сефадексі G-25 фірми Pharmacia. Розчин ферменту наносили на колонку (1,6x65) та елюювали фосфатно-цитратним буфером (0,15 моль/дм³) рН 4,5 зі швидкістю 30-35 см³. Фракції елюату (6 см³) збирали за допомогою колектора фракцій та визначали в них місткість білку за методом Лоурі, а також активність α -галактозидази. Потім фермент очищували гель-фільтрацією на колонці з сефадексом G-100(2,5x35 см). Елюювання проводили тим же буферним розчином зі швидкістю 8-10 см³.

Гомогенність ферменту визначали методом електрофорезу у ПААГ [56]. Електрофорез проводили в 7,5 % гелі при рН 7,5 (Tris-гліциновий буфер протягом 2,5-3,5 годин при напрузі 260 В и силі 5 мА. Для забарвлення гелів використовували 10% амідочорний 10 В. При визначення молекулярної маси α -галактозидази методом гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-200 використовували наступні білки-мітки: сироватковий альбумін (70 кДа), γ -глобулін за допомогою блакитного декстрину. Молекулярна маса

α - галактозидази дорівнює 112 кДа. Отриманий фермент шляхом висолювання сульфатом амонію з подальшою гель-фільтрацією на сефадексі G-25 та G-100 підлягав 70-разовому очищення, питома активність склала 422,9 ед/мг. При електрофорезе фермент був гомогенен.

ДР 8 Сушіння в розпилюючій сушарці (л.2,поз.11) Подається повітря нагріте до 190⁰С. Після висушування порошок подається на пакування.

ДР9 Пакування, маркування, відвантаження.

Пакують рибофлавін у металеві банки з лакованою внутрішньою поверхнею, герметично закупорені металевими лакованими кришками по

1 кг. Маркування державною мовою та мовою за контрактом на поставку (назва виробника, адреса, товарний знак, номер партії, маса нетто, дата виготовлення, строк придатності).

3.3 Схема поетапного контролю біосинтезу гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х

Таблиця 3.2– Схема поетапного контролю за параметрами технологічних процесів виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х

Назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативи і характеристик а показника, що визначається
Санітарна підготовка виробництва	Стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль	Стерильність, відсутність сторонньої мікробіоти
Підготовка персоналу	Стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль	Відсутність сторонньої мікробіоти
Підготовка виробничих приміщень	Стерильність, температура	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль	Стерильність, відсутність сторонньої мікробіоти, $t=20^{\circ}\text{C}$
Підготовка обладнання та комунікацій	Стерильність, температура, тиск, час	Мікробіологічний контроль, Перевірка ступеню частоти	Після підготовки обладнання та комунікацій	Відсутність сторонньої мікробіоти, $t=130^{\circ}\text{C}$, $\tau=4$ год, $P=0,18-0,2$ Па
Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів	Температура, концентрація	—	—	$t=40^{\circ}\text{C}$, 5 мл миючого на 995мл води, 792 мл 96% спирту, 208 мл очищеної води
Очищення повітря	Очищення повітря	Перевірка ступеню частоти	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	Відсутність домішок і сторонньої мікрофлори на 100% $E=99,999\%$
Приготування та стерилізація піногасника	Температур, тиск, час	—	—	$t=120-122^{\circ}\text{C}$, $\tau=2$ год, $P=0,12$ Па
Приготування поживного середовища	Температура, рН, стерильність, Кількість інгредієнтів	рН-метр, Мікробіологічний контроль, термометр	Мікробіологічний контроль	рН=5,6 $\tau=30$ хв. Відсутність мікробіоти М'ясний екстракт - 0,2 г/л, пептон 3

				казеїну – 0,2 г/л, Дріжджовий екстракт – 0,1 г/л, двузамінний фосфат калію – 0,04 г/л, цитрат амонію – 0,04 г/л, D-глюкоза – 0,4 г/л, твін – 0,02 г/л, ацетат натрію – 0,1 г/л, Сульфат магнію – 0,004 г/л, сульфат марганцю – 0,001 г/л, хлорид марганцю – 0,0035 г/л
Приготування посівного матеріалу	Температура , рН, стерильність	рН-метр , Мікробіологічний контроль , термометр	Мікробіологічний контроль	рН=6,0-7,0 τ= 30 хв. Відсутність мікробіоти
Ферментація	рН, температура, вирощування культури та її чистоти	Термомет, рН-метр, мікроскопіювання	Періодично раз в 30 хвилин	T= 37 ± 1 оС рН = 6,0- 7,0 τ= 8-12 годин відсутність сторонньої мікрофлори
Центрифугування	Швидкість, тривалість	—	—	τ=15-20хв оберти 2000-3000 об/хв
Сушіння	Температура, після видалення зайвої вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	t=30 оС W= 10%
Пакування, маркування, відвантаження	Стерильність, герметичність, упакування	Мікробіологічний контроль	Після пакування та маркування	Тара вагою 1 кг
Знешкодження відходів	—	Мікробіологічний контроль	Під час знешкодження відходів	—

3.4 Вимоги до якості готової продукції

Гідролітичний ферментний препарат Галактолонгін Г 10х звільнений від сертифікації. Сертифікація цієї добавки-фарбника не потрібна для захисту здоров'я населення, і тому її партії звільняються від сертифікаційних вимог розділу 721 (с) GMP.

Таблиця 3.3 – Органолептичні і фізико-хімічні показники ферментного препарату Галактолонгін Г10х

Деталі	Технічна характеристика
Зовнішній вигляд	Кристалічний порошок від жовтого до оранжево-жовтого, з легким запахом
Активність	$\geq 100,000$
Чистота	$\geq 99,5\%$
Втрата при сушінні	Не більше 1,5% (105о, 4 год)
Миш'як	≤ 3
Без свинцю	Не більше 0,5 мг / кг
Кількість аеробних пластин	≤ 1000
Коліформи	≤ 30
Кишкова паличка	Не виявлено в 25 г
Дріжджі	Не виявлено в 25 г
Сальмонела	Не виявлено в 25 г

3.5 Інженерно-технічне забезпечення технологічного цеху

3.5.1.Архітектурно-будівельна частина проекту виробництва

Каркас одноповерхового промислового будинку - основна несуча конструкція, що являє собою систему поперечних рам, які складаються з колон, жорстко зароблених в окремо стоячі фундаменти і жорстко зв'язаних з ригелями у виді балок покриття, по верхнім поясам яких створюють настил під покрівлю [57].

Основні обгороджуючі конструкції покриття: настили, пароізоляція, теплоізоляція, вирівнюючий шар асфальту чи цементного розчину.

Настил проектується з залізобетонних ребристих плит, що укладаються на верхні пояси балок і кріпляться до них зварюванням закладних деталей.

Пароізоляційний шар захищає теплоізоляцію від зволоження водяними парами, у покриття проникаючими з приміщень, його виконують з 1-2 шарів руберойду, що наклеюється на бітумну мастику.

Зовнішні стіни в будинку з повним каркасом ніякого навантаження крім власної ваги не несуть; тому називаються самонесучи. Вони виконують тільки обгороджуючу функцію. Такі стіни проектується з крупнорозмірних стінових панелей довжиною 6 м. Стійкість торцевих стін забезпечується колонами фахверка (вітровими). Колони виконують сталевими з прокатних профілів, регеля з залізобетону.

Колони фахверка встановлюють з нульовою прив'язкою, між колонами основного каркаса з кроком 6 м. Для поділу внутрішніх обсягів будинку на окремі виробничі, допоміжні, складські й інші приміщення застосовують перегородки. Їх виготовляють із крупно розмірних залізобетонних, гіпсобетонних і гіпсожужільних панелей товщиною 80-100 мм.

Панельні перегородки кріплять до стін і елементів каркаса за допомогою анкерів. Внутрішні стіни і перегородки розміщують по розбивчим осям, у разі потреби - між осями. Розміри і розміщення віконних прорізів визначають відповідно до вимог раціональної організації природного висвітлення, аерації прим [58].

У внутрішній обробці приміщень панельних стінах передбачають тільки замірку швів. В основних виробничих приміщеннях, мийних відділеннях, лабораторії, душових, туалетах нижні частини стінових панелей, перегородок, а також поверхні залізобетонних колон на висоту 1,8 м облицьовують глазурованою плиткою. В інших приміщеннях передбачають масляні панелі на висоту 1,8 м. Конструкції, що утворюють стелі, затирають цементним розчином.

Стіни вище панелей і стелі білять чи офарблюють клейовими фарбами світлих тонів. У холодильних камерах стелі затирають, стіни штукатурять по ізоляційному матеріалу і роблять вапняну побілку. Заповнення віконних і дверних прорізів офарблюють олійною фарбою 2 рази.

Побутові приміщення підприємства вимагають особливого санітарного режиму і відноситься до IV групи. До складу побутових приміщень цієї групи входять: гардеробні для збереження вуличного і домашнього одягу і гардеробні для збереження робочого одягу, душові, умивальні, убиральні, а також спеціальні приміщення: кімната медичного огляду, сан піст, приміщення для особистої гігієни жінок [59].

При головному вході у виробничий корпус і допоміжні приміщення передбачають вестибюль.

Гардеробні приміщення для збереження вуличного, домашнього і спеціального одягу проектують зального типу (без коридорів). Входи в гардеробні, розташовані суміжно з вестибюлем, передбачають через тамбур. Проектуючи гардеробні блоки, виключають можливість перетинання потоків руху працюючих.

Гардеробні, призначені для збереження робочого одягу, розміщують ізоляційно від приміщень, де зберігається вуличний одяг і домашній. Одяг зберігається закритим способом (у шафах). Кількість шаф приймають рівним загальній кількості працюючих у всіх змінах. Розміри стандартних шаф - глибина 50 см, висота 165 см, ширина 33 см (для збереження вуличного і домашнього одягу). Шафи для збереження робочого одягу мають ширину 25 см² при звичайному складі.

Душові розміщують суміжно з гардеробними. При них розташовують переддушеву та туалет. Душові кабінки відокремлюються одна від іншої вологостійкими перегородками висотою 1,6 м, що не доходять до підлоги на 0,2 м.

Переддушева обладнана лавами шириною 0,3 м з розрахунку 0,4 м на одну людину, з розрахунком трьох місць на одну душову сітку. Відстань між рядами лав дорівнює 1,0 м.

Умивальні розміщують суміжно з гардеробними робочого одягу. Відстань від умивальників до шаф - не менш 2 м. Застосовують групові круглі умивальники - 90 см на 5 місць і 140 см на 8 місць. Ширина проходу між рядами умивальників не менш 2,0 м, а між крайніми рядами умивальників і стіною - 1,5 м. Ширина проходу між груповими круглими умивальниками і стіною дорівнює 0,9 м, між умивальниками 1,2 м. Кількість кранів в умивальниках установлюють по числу працюючих у найбільш численну зміну. Відстань між осями кранів умивальників у ряді дорівнює 0,65 м. На виробництві IV групи один кран на 10 чоловік, що працюють у найбільш численній зміні.

Вхід у вбиральні встановлюють через тамбури з дверима, які самі закриваються. Кількість унітазів і пісуарів у вбиральнях залежить від числа людей у найбільш численній зміні з розрахунку 15 чоловік на один прилад. Кількість унітазів не більш 16 штук.

Двері в кабінах повинні відкриватися назовні, перегородки по висоті рівні 1,8 м і на 0,2 м не доходять до підлоги [60].

3.5.2.Опалення, вентиляції та кондиціонування повітря виробничих приміщень

Опалення призначене для забезпечення температурних умов у приміщенні відповідно до вимог санітарних норм у холодну та перехідну пору року [61].

Опалюватись може все приміщення, а також окремі робочі місця.

Системи вентиляції, опалення і кондиціонування повітря у комплексі з технологічними заходами щодо зменшення шкідливих виробничих речовин разом з архітектурно-планувальними та конструктивними рішеннями будівель і приміщень забезпечують метеорологічні умови і вміст шкідливих

речовин у повітрі робочої зони виробничих приміщень у відповідності до нормативних вимог.

Призначення вентиляції – забезпечити чистоту повітря і певні метеорологічні умови у приміщеннях. За допомогою вентиляції видаляється забруднене або нагріте повітря із приміщення та подається свіже. Залежно від способу переміщення повітря вентиляція може бути природною, механічною або змішаною. Кондиціонування повітря – це створення і автоматична підтримка у приміщеннях незалежно від зовнішніх умов постійних або змінних за відповідною програмою температури» вологості, найбільш придатних для людини та нормального проходження технологічного процесу [62].

3.5.3.Водопостачання, каналізації та очистки виробничих стічних вод

Водопостачання підприємств повинно проводитися приєднанням їх до централізованої мережі водопроводу. Якість води, використовуваної для технологічних, питних і господарсько-побутових потреб, має відповідати вимогам санітарних правил і норм (СанПіН 2.1.4.1074-01 «Питна вода. Гігієнічні вимоги до якості води централізованих систем питного водопостачання. Контроль якості» або СанПіН 2.1.4.544 -96 «Гігієнічні вимоги до якості питної води при нецентралізованому водопостачанні»).

Артезіанські свердловини і запасні резервуари повинні мати зони санітарної охорони не менше 25 м. За їх санітарно-технічним станом і за якістю води, що подається в резервуари і виробничі цехи, повинен бути встановлений систематичний контроль у строки, встановлені органами держсанепіднагляду (хімічний аналіз проводиться не рідше одного разу на квартал, бактеріологічний - не рідше одного разу на місяць). Залежно від епідеміологічної обстановки кратність аналізів може бути змінена, незалежно від джерела водопостачання. При цьому приміщення водяних баків для запасної води повинні бути ізольовані.

Пристрій системи каналізації підприємства повинен відповідати вимогам СНіП «Каналізація. Зовнішні мережі та споруди», «Внутрішній водопровід і каналізація будинків» [63].

Для видалення виробничих і господарсько-побутових стічних вод підприємства повинні бути приєднані до загальноміської каналізації або мати самостійну каналізацію та очисні споруди.

Внутрішня система каналізації виробничих та господарських побутових стічних вод повинна бути роздільної з самостійним випуском в дворову мережу.

Забороняється скидання у відкриті водойми виробничих і побутових вод без відповідного очищення, а також пристрій поглинаючих колодязів [64].

Поживне середовище MRS стерилізують в ферментері (1 год при температурі 120⁰C). Стерильним розчином NaOH доводять рН отриманого середовища до 6,0, що є оптимальним для культивування штаму-продуцента *Bifidobacterium longum* з метою максимального накопичення α – галактозідازی.

Посівний матеріал (0,75-2%) пророщують протягом 24-год при 37 ⁰C. в ферментері Р-2.

Виробничу культуру отримують глибинним способом в ферментері Р-8 об'ємом 1 м³, коефіцієнт заповнення 0,6. Отриманий фермент шляхом висолювання сульфатом амонію з подальшою гель-фільтрацією на сефадексі G-25 та G-100 підлягав 70-разовому очищення, питома активність склала 422,9 ед/мг. При електрофорезе фермент був гомогенен.

Сушіння в розпилюючій сушарці Н-19 (подається повітря нагріте до 190⁰C). Порошок подається на пакування.

Таблица 3.4-Характеристика основного оборудования

Реактор	Реактор з мішалкою об'ємом 50 л. Нержавіюча сталь AISI 316L. Завод виробник: "Bio Techno Group" (л.1,поз.4)	2
Теплообмінник	Теплообмінники трубчасті Марка ТН Габарити 2000×9000 Води 100м3/год. поверхня охолодження 50 м ² Маса 785кг Виробник Україна (л.1,поз.18)	1
Ферментер	Загальний об'єм 30 м ³ Нержавіюча сталь AISI 316L. Швидкість перемішування 40-500об/хв. Завод виробник: "Bio Techno Group" (л.1,поз.6)	4
Центрифуга	Центрифуга ФБВ-303К-04 Частота обертання вала – 2850хв-1 Фактор розділення при частоті обертання, хв-1 1500 375 2440 1000 3460 2000 Місткість 0,05м3 Тривалість розігнання 70 с.	1

Реактор мішалкою	3	Нержавіюча сталь AISI 316L Виробник «Стройторгсервис» Швидкість мішалки до 200 об/хв. (л.1,поз.7)	1
Вакуум-насос		26 Вакуум-насос ротаційний двоплунжерний ВН-6Г Продуктивність 0,155 м3	10

	Граничний тиск 1,33 Па Потужність електродвигуна 20 кВт Маса 1557 кг	
Розпилювальна сушка	Розпилювальна сушарка LPG-5. Продуктивність по випареній волозі 5 кг/год. Діаметр – 1000 мм. Потужність електродвигуна 12 кВт. Нержавіюча сталь SUS316. Завод виробник: “Biorus ”(л.1,поз.11)	1
Машина для пакування	Дозволяє шляхом послідовного виконання функцій дозування та упаковки забезпечити упаковку строго заданих порцій	1
Стіл для маркування	Процес пакування товарів легкий, швидкий та економний. Завдяки своєму оснащенню станція підходить для упаковки як середніх так і малих упаковок в стрейтч-плівку, пакувальну бумагу, або в бульбашкову плівку.	1
Стіл для пакування в групову тару	Дозволяє пакувати продукцію у групову тару	1
Стіл з вагами	Дозволяє зважувати вироблену продукцію по пропорціям	1
Стелажі металеві	Для зберігання виробленої продукції	7
Холодильна камера	Для отримання продукції і охолоджену стані. Зберіганні.	1
Автоклав	герметичний пристрій для здійснення технологічної обробки речовин в герметичній посудині під дією підвищених температур та надлишкового тиску	1

Таблиця 3.5- Таблиця підбору технологічного обладнання

Найменування обладнання	Марка	Продуктивність	Кількість шт	Габарити			Встановлена потужність, кВт
				l	b	h	
Реактор	Ємність Б-3,8	40	2	500	500	900	0,75
Стерилізатор для	ПФ-ОСО-5	–	1	950	700	750	1,4

піногасника							
Ферментер	РФ-65	80	4	3200	3200	7800	1,33
Теплообмінник	ТН	–	1	400	1300	1500	2,7
Центрифуга	ФБВ-303К-04	80	1	700	1160	765	3
Реактор з мішалкою	-	40	1	500	500	900	1,2
Розпилювальна сушка	LPG-5	5	1	500	800	1956	3,2
Автоклав	-		1	600	950	1200	1,5
Машина для пакування	FRT-800	-	1	440	600	440	0,85
Стіл для маркування	-	-	1	400	550	900	1,2
Стіл для пакування в групову тару	-	-	1	500	1100	900	1,5
Стіл з вагами	-	-	1	550	950	600	0,5
Холодильна камера	CM105-S Polair	-	1	400	800	2000	3,7

3.5.4. Розрахунки основного технологічного обладнання

Ферментер – це ємність закритого типу, зазвичай циліндричної форми. Усередині цього резервуару перемішуються середовище (продукт) та бактерії, і відбувається процес бродіння (або як по-науковому, ферментація). Через середу пропускають насичене киснем повітря, і під час перемішування маса стає однорідною. Дуже важливим фактором у цьому процесі є безперервне збереження конкретної температури, яка контролюється та підтримується за допомогою води або пари, що проходять трубками теплообмінника

Відомі різні конструкції вітчизняних та зарубіжних промислових ферментаторів, що відрізняються обсягом, продуктивністю, масообмінними характеристиками та іншими особливостями. Ці відмінності часто пов'язані з тим, що при конструюванні ферментатора враховується ряд факторів, до яких відносяться, наприклад, специфічні властивості субстратів, морфологічні та фізіологічні особливості мікроорганізмів, що

культивуються, способи культивування (в асептичних умовах або без дотримання умов асептики в періодичних і безперервних умовах), фізико-хімічні властивості ферментаційних середовищ. Для культивування мікроорганізмів в асептичних умовах передбачено ферментатори об'ємом від 1 до 200 м³.

Зазвичай ферментер виготовляють із високоякісної нержавіючої сталі, так що він не схильний до корозії і не виділяє в середу токсичні солі металів. Все обладнання, матеріали та повітря, що використовується, повинні бути стерильними. Устаткування стерилізують парою під тиском. Пара повинна мати доступ до всіх поверхонь, які в свою чергу повинні бути гладкими і відполірованими, наскільки це можливо, і не мати тріщин і нерівностей, в яких можуть накопичуватися мікроорганізми. Середовище стерилізують перед інокуляцією, пропускаючи пару через систему охолодження. Повітря стерилізують шляхом фільтрації.

Конструкція ферментатора з геометричним об'ємом 30 м³

$V_{\text{заг}} \text{ ферментера} = 30 \text{ м}^3$, його $D_{\text{вн}} = 2500 \text{ мм}$ ($D_{\text{вн}}$ – внутрішній діаметр ферментатора).

Для інтенсивного перемішування культуральної рідини, рекомендується використовувати турбінні мішалки.

Діаметр турбінної мішалки, згідно стандартам:

$$d_m = (0,3 \div 0,33) \cdot D_{\text{вн}} = 0,3 \cdot 2500 = 750 \text{ мм}$$

$D_{\text{вн}}$ – $D_{\text{вн}}$ – внутрішній діаметр ферментатора.

Для більш ефективного перемішування використовують двійну шестилопатну турбінну мішалку діаметром $d_m = 500 \text{ мм}$.

Для перемішування середовища в'язкістю $\mu = 0,00143 \text{ Па} \cdot \text{с}$,

рекомендується окружна швидкість мішалки $w = 4 \text{ м/с}$.

Число обертів мішалки:

$$n = w/(\pi \cdot d_m) = 4/(3,14 \cdot 0,5) = 2,54 \text{ об/с}$$

Тобто середовище зростаючих культур *Bifidobacterium longum* потрібно інтенсивно перемішувати, то застосовуємо $n = 3 \text{ об/с} = 180 \text{ об/хв}$.

За каталогом для мішалки з таким числом обертів приймаємо вертикальний редуктор типу ВО-VI40/180-1500.

Потужність, що споживається однією мішалкою на перемішування середовища, без урахування впливу допоміжних пристроїв:

$$N_M = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_M^5 = 1,045 \cdot 1065 \cdot 3^3 \cdot 0,5^5 = 6,73 \cdot 10^3 \text{ Вт},$$

де ρ_c – густина середовища, $\rho_c = 1065 \text{ кг/м}^3$;

n і d_M – число обертів і діаметр мішалки, $n = 3 \text{ об/мін}$, $d_M = 0,5 \text{ м}$.

Критерій потужності K_N залежить від інтенсивності перемішування, що характеризується відцентровим критерієм Re_Π :

$$K_N = f(Re_\Pi).$$

$$Re_\Pi = \rho_c \cdot n \cdot d_M^2 / \mu_c = 1065 \cdot 3 \cdot 0,5^2 / 0,00153 = 530060,$$

де ρ_c – – плотність середовища, кг/м^3 ;

n – число обертів, об/сек ;

d_M – діаметр мішалки, м ;

μ_c – динамічна в'язкість середовища, $\mu_c = 0,00153 \text{ Па} \cdot \text{с}$.

Значення $K_N = f(Re_\Pi)$ для турбіної мішалки:

$$K_N \cdot [g]^m = 1$$

$$(n^2 \cdot d_M)$$

$$K_N = 1/[g]^m = 1/[9,81]^{-0,127} = 1,045,$$

$$(n^2 \cdot d_M) (8^2 \cdot 0,15)$$

$$\text{де } m = a - \lg Re_\Pi / b = 1 - \lg 125294,11 / 12,5 = 10 \text{ } 023,5,$$

де a і b – коефіцієнти, $a = 1$, $b = 12,5$.

Розрахункова потужність на валі мішалки:

$$N_p = K_1 \cdot K_2 \cdot (\sum K + 1) \cdot N_M = 1,33 \cdot 1,1 \cdot (2,15 + 1) \cdot 7,12 = 32,8 \text{ кВт},$$

де N_M – потужність, яка використовується однією мішалкою на перемішуванні середовища, без обліку впливу допоміжних пристроїв (розрахована раніше).

K_1 – коефіцієнт, що враховує ступінь заповнення апарату середовищем, що перемішується:

$$K_1 = H_{\text{ж}} / D_{\text{вн}} = 4/3 = 1,33,$$

де $H_{\text{ж}}$ – висота шару рідини, що перемішується, для турбінних мішалок:

$$H_{\text{ж}} = 0,75 \cdot H_{\text{ап}} = 0,15 \cdot 5,1 = 0,765 \text{ м}$$

($H_{\text{ап}}$ – висота апарата, 5,1 м).

Середовище, що використовується для вирощування *Bifidobacterium longum*, у період зростання культури утворює піну. Щоб уникнути викидання піни приймаємо $H_{\text{ж}} = 3$ м. Коефіцієнт, що враховує збільшення споживаної потужності внаслідок підвищення опору середовища у процесі розвитку культури мікроорганізмів, $K_2 = 1,1$.

Суму коефіцієнтів $\sum K$, що враховують збільшення споживаної потужності, що викликається допоміжними пристроями, що знаходяться всередині апарату, приймаємо з таблиці.

— 4 відбивні перегородки шириною $0,08D_{\text{вн}}$ враховує коефіцієнт

$$K_{\text{п}} = 1,5;$$

— додаткова мішалка: $K_{\text{м}} = 0,35$;

— трубка для підведення повітря: $K_{\text{тр}} = 0,2$;

— гільза для термометра: $K_{\text{г}} = 0,1$.

$$\sum K = 1,5 + 0,35 + 0,2 + 0,1 = 2,15.$$

Потужність, необхідна для подолання тертя у сальнику:

$$N_{\text{с}} = 2 \cdot n \cdot d_{\text{в}}^2 \cdot S_{\text{с}} \cdot p \cdot (e^{0,1 \cdot [h_{\text{с}}/S_{\text{с}}]} - 1) = 2 \cdot 3 \cdot 0,08^2 \cdot 0,012 \cdot 0,1 \cdot 10^6 \cdot (e^{0,1 \cdot [0,072/0,012]} - 1) = 38,2 \text{ Вт},$$

де n і $d_{\text{в}}$ – число обертів та діаметр валу, $n = 3$ об/с, $d_{\text{в}} = 0,08$ м;

$S_{\text{с}}$ – товщина набивання сальника валу, $S_{\text{с}} = 0,012$ м;

p – Робочий тиск повітря в апараті над рівнем рідини,

$$p = 1,25 \text{ кгс/см}^2 = 0,25 \cdot 98100 = 24520 \text{ Па};$$

$h_{\text{с}}$ – висота набивання сальника, $h_{\text{с}} = (6 \div 10)S_{\text{с}}$, приймаємо:

$$h_{\text{с}} = 6S_{\text{с}} = 6 \cdot 0,012 = 0,072 \text{ м}.$$

Для визначення $N_{\text{с}}$ рекомендується приймати $p < 105$ Па через можливість підвищення тиску понад прийнятий, приймаємо $p = 0,1 \cdot 106$ Па;

d_b – діаметр приводного валу мішалки, визначається за наближеною формулою, знаходячи з його міцності на кручення:

$d_b = 1,71 \sqrt[3]{M_{кр}} + C = 1,71 \sqrt[3]{1785} + 0,003 = 0,056 \text{ м}$ де 3 - збільшення корозії, ерозію і знос, $C = 3 \text{ мм}$;

$\tau'_{доп}$ – допустима напруга для матеріалу валу на кручення, $\tau'_{доп} = 70 \text{ МН/м}^2$;

$M_{кр}$ - крутний момент на валу мішалки,

$M_{кр} = 0,163 \cdot N_p / n = 0,163 \cdot 32800 / 3 = 1785 \text{ Н/м}$,

N_p – передана розрахункова потужність на валу мішалки,

$N_p = 32,8 \cdot 103 \text{ Вт}$.

Для забезпечення твердості приймаємо $d_b = 70 \text{ мм}$. Матеріалом валу приймаємо сталь марки Ст 45. Для цього матеріалу межа міцності на розтяг (ГОСТ 1050), $\sigma_b = 610 \text{ МН/м}^2$ (близько 62 кг/мм^2). Приймаємо запас міцності $\text{верб} = 2,6$.

Допустима напруга на розтягування:

$\sigma_{доп} = 610 / 2,6 = 234 \text{ МН/м}^2$ (приблизно $23,8 \text{ кг/мм}^2$).

Допустима напруга на кручення:

$\tau_{доп} = 0,6 \cdot \sigma_{доп} = 0,6 \cdot 234 = 140 \text{ МН/м}^2$ (приблизно $14,25 \text{ кг/мм}^2$).

Для валів пристроїв, що перемішують, допустима напруга на кручення:

$\tau'_{доп} = 0,5 \cdot \tau_{доп} = 0,5 \cdot 140 = 70 \text{ МН/м}^2$ (около $17,13 \text{ кг/мм}^2$).

Товщина сальникового набивання:

$S_c = 0,044 \cdot \sqrt{d''_b} = 0,044 \cdot \sqrt{0,08} = 0,0124 \text{ м} \approx 12 \text{ мм}$,

де d''_b – діаметр валу при проході через сальник, приймаємо

$d''_b = 0,08 \text{ м}$.

Остаточна настановна потужність приводного електродвигуна мішалки:

$N_{уст} = 1,15 \cdot (N_p + N_e) = 1,15 \cdot (32,8 + 0,0382) = 39,8 \text{ кВт}$,

де η – к.п.д. редуктора приводу, $\eta = 0,95$.

По нормалі підбираємо вертикальний привід ВО-VI40/180-1500 тип А. Вихідний вал редуктора обертається зі швидкістю 180 об/хв, $N_{\text{ел}} = 40 \text{ кВт}$, $n_{\text{ел}} = 1460 \text{ об/хв}$.

3.5.5. Тепловий розрахунок ферментатора

Робочий обсяг ферментатора $V_p = 30 \text{ м}^3$.

Тепловиділення становитиме $2820/0,18 = 15670 \text{ кДж/кг}$ цукру.

На підставі експериментальних даних вважаємо, що засвоєння казеїну культурою мікроорганізмів, що розвивається, відбувається протягом 24 год. Для спрощення розрахунків приймаємо, що тепловиділення в цей період відбувається рівномірно.

Тоді кількість біологічного тепла, що виділяється цією культурою:

$$Q_{\text{сек}} = 1\,871 \cdot 15670 \cdot 10^3 = 2931 \cdot 10^2 \text{ Вт.}$$

Щоб уникнути перегріву середовища, виділення тепло відводять. Тепло відводиться охолоджувальною водою $Q_{\text{вод}}$, повітрям $Q_{\text{воз}}$, що подається на аерування культури, тепловипромінюванням $Q_{\text{п}}$.

Тепловий баланс ферментера:

$$Q_{\text{сек}} = Q_{\text{вод}} + Q_{\text{возд}} + Q_{\text{п}}$$

У розрахунках $Q_{\text{воз}}$ можна не брати до уваги, т.к. величина його незначна, оскільки повітря подають до апарату з температурою, близькою до температури середовища: $t_{\text{ср}} - 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Втрати на тепловипромінювання у довкілля приймаємо 2 % від Q :

$$Q_{\text{п}} = 0,02 \cdot 2931 \cdot 10^{10} = 58,6 \cdot 10^2 \text{ Вт.}$$

Тепло, що відводиться водою:

$$Q_{\text{вод}} = Q_{\text{сек}} - Q_{\text{п}} = 2931 \cdot 10^2 - 58,6 \cdot 10^2 = 2871,4 \cdot 10^2 \text{ Вт.}$$

Витрата води для відведення тепла (охолодження ферментатора):

$$G_{\text{вод}} = \underline{Q_{\text{вод}}} = 2871,4 \cdot 10^2 = 8,9 \text{ кг/с}$$

$$c \cdot (t_2 - t_1) \cdot 1000 \cdot 4186 \cdot (22 - 15)$$

де t_1 та t_2 – температура води при вході в сорочку ($t_1 = 15 \text{ }^\circ\text{C}$) та при виході з сорочки ($t_2 = 22 \text{ }^\circ\text{C}$).

Потрібна поверхня охолодження ферментатора:

$$F = Q_{\text{вод}} / (K \cdot \Delta t_{\text{cp}}),$$

Де K – коефіцієнт теплопередачі від охолоджувальної води до середовища, що охолоджується:

$$\Delta t_{\text{г}} = 30 - 15 = 15^{\circ}$$

$$\Delta t_{\text{м}} = 30 - 22 = 8^{\circ}$$

$$\Delta t_{\text{г}} / \Delta t_{\text{в}} = 15 / 8 < 2$$

Для цього випадку середня різниця температур теплоносіїв:

$$\Delta t_{\text{cp}} = (\Delta t_{\text{г}} + \Delta t_{\text{м}}) / 2 = (15 + 8) / 2$$

По таблиці 2 приймаємо значення $D_0 = 800 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{До})$.

Забруднення стінок відкладеннями в процесі експлуатації призводить до погіршення коефіцієнта теплопередачі, тому для розрахунку приймаємо $K = 700 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$.

Тоді:

$$F = 2871,4 \cdot 10^2 / (700 \cdot 11,5) = 35,6 \text{ м}^2$$

При діаметрі корпусу ферментатора $D_{\text{н}} = 3 \text{ м}$ висота сорочки:

$$H_{\text{р}} = F = 35,6 = 3,5 \text{ м.}$$

$$(\pi \cdot D_{\text{н}}) (3,14 \cdot 3)$$

Тобто можна сказати, висота оболонки не перевищує висоту робочої зони ферментера, тому обраний ферментер може бути використаний в технологічному процесі. Основні габаритні розміри та монтажні під'єднання приведені на кресленні.

3.6. Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс отримання

α -галактозідази

Потреба в продукті α -галактозідази складає $G_{нд} = 300$ кг. За умовами замовника цю кількість α -галактозідази потрібно виробити за 300 днів. За даними максимальний синтез α -галактозідази досягається за умов росту штаму *Bifidobacterium longum* на середовищі такого складу (г/л):

М'ясної екстракт– $C_1 = 0,2$

Пептон з казеїну– $C_2 = 0,2$

Дріжджовий екстракт– $C_3 = 0,1$

Двузамінний фосфат калію– $C_4 = 0,04$

Цитрат аммонію– $C_5 = 0,04$

D- глюкоза– $C_6 = 0,4$

Твін– $C_7 = 0,02$

Ацетат натрію – $C_8 = 0,1$

Сульфат магнію– $C_9 = 0,004$

Сульфат марганцю– $C_{10} = 0,001$

Хлорид марганцю– $C_{11} = 0,0035$

Всього – $C_{\Sigma\phi} = 45,67$

Для розрахунку використовували наступні коефіцієнти: $K_1 = 1,1$;

коефіцієнт заповнення ферментера, частка $K_{зп} = 0,6$; коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{па} = 0,6$; коефіцієнт заповнення інокулятора, частка $K_{ін} = 0,6$; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{кол} = 0,6$; коефіцієнт заповнення збірника, частка $K_{зб} = 0,8$.

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_v = 0,35$; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка $X_f = 0,1$; кількість посівного матеріалу для посівного апарату, частка $X_{па} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка $X_{ін} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка $X_{кол} = 0,1$; втрати культуральної рідини при отриманні, частка $E_f = 0,1$; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівних апаратах, частка $E_{па} = 0,05$; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в качалочних колбах, частка $E_{кол} = 0,01$.

3.6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

Кількість продукту на добу, $G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 300/300 = 1 \text{ кг/добу}$

Кількість продукту за добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{св}$):

$$G_{пд} = G_{нтд} / (1 - E_{св}) = 1 / (1 - 0,35) = 0,65 \text{ кг/доба}$$

Кількість ферменту α -галактозидози за цикл:

$$G_{цд} = G_{пт} * T_{рд} / 24 = 0,65 * 130 / 24 = 3,5 \text{ кг/цикл}$$

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

$$V_{кр} = (K_1 * V_{д} * T_{цф}) / 24 = (1,1 * 1 * 130) / 24 = 5,95 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{ц} = G_{зад} * G_{цд} = 300/3,5 = 85,7 = 86$$

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для виробництва α -галактозидози продуцентом *Bifidobacterium longum*.

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 5,95 \text{ м}^3$ культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її витрати в

результаті краплевносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед отриманням ферменту становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5,95 / (1 - 0,15) = 7 \text{ м}^3,$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини під час отримання ферменту.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 7 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховують геометричний об'єм ($V_{\text{ф}}$), що становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 7 / 0,6 = 11,66 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер

$$V_{\text{сф}} = 12,50 \text{ м}^3.$$

Уточнюємо раніше прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 7 / 12,5 = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс.1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 7 / (1 + 0,1) = 6,4 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{ф}}$ - доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість поживного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс.1}} = 7 - 6,4 = 0,6 \text{ м}^3$$

Для одержання 0,6 м³ інокулятору в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм.1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,6 / (1 - 0,10) = 0,66 \text{ м}^3$$

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

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 0,66 / (1 + 0,1) = 0,6 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,66 - 0,6 = 0,06 \text{ м}^3 \text{ або } 60 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,66 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування *Bifidobacterium longum* у посівному апараті геометричний об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 0,66 / 0,6 = 1,1 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 1,25 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 0,66 / 1,25 = 0,52. \quad (3.15)$$

Для одержання 60 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо

втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 60 / (1 - 0,10) = 67 \text{ л.}$$

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

$$V_{\text{пс.3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 67 / (1 + 0,1) = 61 \text{ м } 3 ,$$

де $X_{\text{ін}}$ - доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм.3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс.3}} = 67 - 61 = 6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.3}} = 67 \text{ л}$ можна одержати під час культивування *Bifidobacterium longum* в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 67 / 0,6 = 112.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 125 \text{ л}$ та уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сф}} = 67 / 125 = 0,53$$

Для одержання 6 л посівного матеріалу в малому інокуляторі

враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор

відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища для малого інокулятора перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 6 / (1 - 0,1) = 6,7 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу для малого інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі.

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс.4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,7 / (1 + 0,1) = 6 \text{ л, (3.22)}$$

де $X_{\text{ін}}$ - доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс.4}} = 6,7 - 6 = 0,7 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.4}} = 6,7 \text{ л}$ можна одержати під час культивування *Bifidobacterium longum* в малому інокуляторі:

$$V_{\text{ін4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 6,7 / 0,6 = 11,2 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер

$V_{\text{сф}} = 12,50 \text{ л}$, уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сф}} = 6,7 / 12,50 = 0,53.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм.4}} = 0,7 \text{ л}$ можна одержати культивуванням *Bifidobacterium longum* у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм.4}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 700 / (750 * 0,2) = 4,6.$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних ковб.

3.6.2.Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу.

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі, частка

$E_{\phi} = 0,1$ складе:

$$V_{\phi} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 5950 / (1 - 0,1) = 6611 \text{ л}$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера, л:

$$V_{псф} = V_{\phi} / (1 + X_{\phi}) = 6611 / (1 + 0,1) = 6010 \text{ л} = 6,010 \text{ м}^3$$

Витрати посівного матеріалу на засів виробничого ферментера:

$$V_{пмф} = V_{\phi} - V_{псф} = 6611 - 6010 = 601 \text{ л.}$$

3.6.3.Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого отримання ферменту α -галактозидози загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псф}$ складуть:

$$G_{\phi} = V_{псф} * C_{\Sigma\phi} = 6,010 * 45,67 = 274,47 \text{ кг,}$$

в тому числі:

М'ясной екстракт:

$$G_2 = G_{\phi} * C_2 / C_{\Sigma\phi} = 274,47 * 0,2 / 45,67 = 1,2;$$

Пептон з казеїну:

$$G_3 = G_{\phi} * C_3 / C_{\Sigma\phi} = 274,27 * 0,2 / 45,67 = 1,2;$$

Дріжджовий екстракт:

$$G_4 = G_{\text{ф}} * C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,1 / 45,67 = 0,6;$$

Двузамінний фосфат калію:

$$G_5 = G_{\text{ф}} * C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,004 / 45,67 = 0,02;$$

Цитрат аммонію:

$$G_6 = G_{\text{ф}} * C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,04 / 45,67 = 0,24;$$

D-глюкоза:

$$G_7 = G_{\text{ф}} * C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,4 / 45,67 = 2,4;$$

Твін:

$$G_8 = G_{\text{ф}} * C_8 / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,02 / 45,67 = 0,12;$$

Ацетат натрію:

$$G_9 = G_{\text{ф}} * C_9 / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,1 / 45,67 = 0,6;$$

Сульфат магнію:

$$G_{10} = G_{\text{ф}} * C_{10} / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,04 / 45,67 = 0,024;$$

Сульфат марганцю:

$$G_{11} = G_{\text{ф}} * C_{11} / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,001 / 45,67 = 0,006;$$

Хлорид марганцю:

$$G_{12} = G_{\text{ф}} * C_{12} / C_{\Sigma\text{ф}} = 274,27 * 0,0035 / 45,67 = 0,02;$$

Всього 274,47.

3.7.Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 3.6 - Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

1. Приготування ПС для вирощування інокуляту в колбах качалках			
М'ясний екстракт	0,2	Нестерильне ПС	0,7075
Пептон з казеїну	0,2		
Дріжджовий екстракт	0,1		
Двузамінний фосфат калію	0,04		
Цитрат амонію	0,04		
D-глюкоза	0,4		
Твін	0,02		
Ацетат натрію	0,1		
Сульфат магнію	0,004		
Сульфат марганцю	0,001		
Хлорид марганцю	0,0035		
Всього	0,7075	Всього	0,7075
2. Стерилізація ПС в автоклаві			
Нестерильне ПС	0,7075	Стерильне ПС	0,7075
Всього	0,7075	Всього	0,7075
3. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках			
Стерильне ПС	0,7075	посівний матеріал	0,7175

Посівний матеріал з колб	0,7075		
Втрати (частка)	0,01	Втрати (кількість)	0,007175
Всього	0,7175	Всього	0,7175
4. Приготування ПС для інокулятора 20 л			
М'ясний екстракт	4	Нестерильне ПС	22,17
Пептон з казеїну	4		
Дріжджовий екстракт	2		
Двузамінний фосфат калію	0,8		
Цитрат амонію	0,8		
D-глюкоза	8		
Твін	0,4		
Ацетат натрію	2		
Сульфат магнію	0,08		
Сульфат марганцю	0,02		
Хлорид марганцю	0,07		
Всього	22,17	Всього	22,17
5. Стерилізація ПС для інокулятора 20 л			
Нестерильне ПС	22,17	Стерильне ПС	22,6966542
Конденсат	0,526654250	(втрат немає)	
Всього	22,6966542	Всього	22,6966542
6. Вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі 20л			
Стерильне ПС	22,6966542	Посівний матеріал	22,6966542
Посівний матеріал з колб	0,7175		
Втрати (частка)	0,05		0,289659832
Всього	23,4641542	Всього	23,4641542
7. Приготування ПС для інокулятора 200 л			

М'ясний екстракт	40	Нестерильне ПС	221,7
Пептон з казеїну	40		
Дріжджовий екстракт	20		
Двузамінний фосфат калію	8		
Цитрат амонію	8		
D-глюкоза	80		
Твін	4		
Ацетат натрію	20		
Сульфат магнію	0,8		
Сульфат марганцю	0,2		
Хлорид марганцю	0,7		
Всього	221,7		221,7
8. Стерильне ПС для інокулятора 200л			
Нестерильне ПС	221,7	Стерильне ПС	227,203537
Конденсат	5,503536928	Втрат немає	
Всього	227,203537		227,203537
9. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 200л			
Стерильне ПС	227,203537	Посівний матеріал	229,730129
Посівний матеріал з інокулятора	5,503536928		
Втрати (частка)	0,05	Втрати (кількість)	3,026945310
Всього	232,757074		232,757074
10. Приготування ПС для посівного апарату 2.0 м ³			
М'ясний екстракт	400	Нестерильне ПС	2217
Пептон з казеїну	400		
Дріжджовий екстракт	200		
Двузамінний фосфат калію	80		
Цитрат амонію	80		
D-глюкоза	800		
Твін	40		
Ацетат натрію	200		
Сульфат магнію	8		
Сульфат марганцю	2		
Хлорид марганцю	7		
Всього	2217	всього	2217
11. Стерилізація ПС в посівному апараті 2,0 м ³			
Нестерильне ПС	2217	Стерильне ПС	2438,7
Конденсат 10%	221,7	(втрат немає)	
Всього	2438,7	Всього	2438,7
12. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті 2,0 м ³			
Поживне середовище	2438,7	посівний матеріал	2650,98843
Посівний матеріал з інокулятора	243,87		
втрати	0,05	втрати (кількість)	31,63157
Всього	2682,62	всього	2682,62

13. Приготування ПС для ферментера 16м ³			
М'ясний екстракт	3200	Нестерильне ПС	11336
Пептон з казеїну	3200		
Дріжджовий екстракт	1600		
Двузамінний фосфат калію	640		
Цитрат амонію	640		
D-глюкоза	6400		
Твін	320		
Ацетат натрію	1600		
Сульфат магнію	64		
Сульфат марганцю	16		
Хлорид марганцю	56		
Всього	11336	всього	11336
14. Стерилізація ПС для ферментера 16м ³			
Нестерильне ПС	11336	Стерильне ПС	12538
розбавлення конденсатом 20 %	1202		
Всього	12538	Всього	12538
15. Виробничий біосинтез			
Стерильне ПС	12538	культуральна рідина	13130,8
посівний матеріал з посівного апарату	1253,8	13130,8	
Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	661,1
Всього	13791,9	Всього	13791,9

4. ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Маркетингове дослідження ринку

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

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

Сучасний стан розвитку ринку ферментних препаратів на сьогодні окреслений в оглядах дослідницької компанії Abercade. Компанія утворена в 1999 р. і спеціалізується на вивченні промислових ринків і технологій.

Починаючи з 2001 р. Abercade публікує щорічні доповіді про стан біотехнологічного ринку. З 2005 р. Abercade випускає щорічні моніторинги ринку за окремими сегментами: ферменти, амінокислоти, біопаливо тощо.

Згідно з дослідженнями Abercade Consulting, глобальний ринок ферментних препаратів щорічно збільшується в середньому на 10 %, європейський ринок – приблизно на 3,5 %. Ринок ферментів для харчової індустрії в Європі щорічно зростає на 8 %.

Даних щодо фізичного обсягу ринку ферментних препаратів України в доступних джерелах інформації не знайдено. Загальною тенденцією для України є те, що сучасні потреби промисловості у ферментних препаратах більш ніж на 90 % задовольняються за рахунок імпорту. На частку українських виробників припадає менше 10 %. При цьому впродовж останніх кількох років внутрішнє виробництво демонструє тенденцію до скорочення,

що зумовлено значною конкуренцією з боку зарубіжних фірм, які пропонують широкий асортимент високоякісної продукції. Як відзначають споживачі ферментів, якісні характеристики продуктів провідних західних фірм виправдовують більш високу вартість цих препаратів.

В експрес-аналізі зовнішньоекономічної діяльності на ринку ферментних препаратів, представленому Агентством промислових новин, підтверджується, що цей сектор є імпортом залежним. Загалом в останні роки експорт ферментних препаратів з України становить суму в 52 рази нижчу за суму імпорту. Це відбувається на фоні зниження конкурентоспроможності продукції українських підприємств у секторі виробництва промислових ферментів на зовнішньому ринку.

Наразі виробництво α -галактозидази припадає на закордонні компанії.

Світовий ринок α -галактозидаз досить конкурентоспроможний і включає ключових гравців на глобальному і регіональному рівнях. Великі гравці ринку зосереджені на розробці продуктів і приймають різні стратегії, такі як злиття та поглинання, партнерські відносини, ліцензійні угоди, спільні підприємства та співробітництво, щоб розширити свою продуктову базу і зміцнити свої позиції на ринку.

Провідні виробники на ринку α -галактозидази:

DSM, Novozymes, DuPont, Chr. Hansen Holding, Amano Enzyme, Enzyme Development, SternEnzym, Specialty Enzymes & Biotechnologies, Enzyme Solutions, Advanced Enzymes, Zhongnuo BioTech, Enze Bio, Meihua BioTech, Kono Chem.

Сьогодні цей ферментний препарат можна зустріти на ринку у вигляді кристалічного порошку або маленьких гранул. Вартість на ринку складає від 1200 до 2000 гривень за 1 кг.

4.2. Техніко-економічне обґрунтування отримання гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х

Виробництво і реалізація α -галактозидози, гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х, планується на заводі Інтерхім в місті Одеса у обсязі – 300 кг. За умовами замовника цю кількість α -галактозидози потрібно виробити за 300 днів. За даними максимальний синтез α -галактозидози досягається за умов росту штаму *Bifidobacterium longum*.

Гідролітичний ферментний препарат Галактолонгін Г10х застосовується в харчовій промисловості при переробці рослинної сировини.

Субстратом для α -галактозидози є α -галактозиди, включаючи рафінозу, стахіозу та інші, які є основними олігосахаридами сої. Препарати α -галактозидози насамперед знаходять широке застосування при переробці сої. Галактоолігосахариди (переважно рафіноза) викликають у деяких людей небажані дисфункції шлунково-кишкового тракту. З іншого боку, існують докази, що ці олігосахариди мають пребіотичні властивості, збільшуючи число біфідобактерій у товстому кишечнику.

4.3. Розрахунок економічної ефективності проекту

Розрахунок інвестицій у проект

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

$$I = I_{\text{буд}} + V_{\text{уст}} + T + M + H + V_{\text{зал}} + Д - Л + \Delta ОА,$$

де $I_{\text{буд}}$ – витрати на будівельні роботи,

$V_{\text{уст}}$ – вартість придбання устаткування;

T – транспортні витрати по устаткуванню (5 % від вартості придбання устаткування);

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

Н – невраховані витрати (2 % від вартості придбання устаткування, тис. грн.); $V_{\text{Зал}}$ – залишкова вартість демонтованого устаткування, 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.

ΔOA – приріст власних обігових активів, тис. грн.

Для отримання α -галактозидози потрібно таке основне устаткування технологічної лінії:

1. Реактор з мешалкою об'ємом 50 л, 2 одиниці по 30 тис. грн = 60 тис. грн.
2. Теплообмінники трубчасті Марка ТН, 100м³/год – 20 тис. грн.
3. Ферментер, 4 одиниці по 25 тис. грн = 100 тис. грн.
4. Центрифуга ФБВ-303К-04 – 30 тис. грн.
5. Реактор з мішалкою – 80 тис. грн.
6. Вакуум-насос ВН-6Г – 10 одиниць по 19 тис. грн = 190 тис. грн.
7. Розпилювальна сушарка LPG-5 – 50 тис. грн.
8. Машина для пакування – 50 тис. грн.
9. Стіл для маркування – 10 тис. грн.
10. Стіл для пакування в групову тару – 30 тис. грн.
11. Стіл з вагами – 20 тис. грн.
12. Стелажі металеві – 2 од. по 2 тис. грн = 4 тис. грн.
13. Холодильна камера – 20 тис. грн.

14. Автоклав – 5 тис. грн.

Вартість обладнання (Вуст) складає: 669 тис. грн.

За умовами виробників обладнання транспортні витрати по устаткуванню (Т) та вартість монтажу устаткування враховано до вартості придбання устаткування.

Інвестиції, які необхідні на придбання нової технологічної лінії:

Вуст = 669 тис. грн.

$$\Delta OA = C_{zag} * k,$$

де C_{zag} – загальна собівартість готової продукції;

k – частка обігових активів (%).

Частка матеріальних витрат у собівартості продукції становить 60-80%. Однак для пускової партії планованого обсягу продукції досить 15 – 25% на покупку необхідних обігових активів, приймаємо 15 %:

$$\Delta OA = 380724 * 0,15 = 57108,6 \text{ грн.}$$

Розрахуємо капітальні вкладення у проект виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х:

$$I = 669 + 57,11 = 726,11 \text{ тис. грн.}$$

Розрахунок виробничої програми

Обсяг виробництва ферменту складає 300 кг, обладнання використовується на 40 %.

Виробнича потужність складає:

$$ВП = 300 / 0,4 = 750 \text{ кг.}$$

Розрахунок чисельності працівників

Технологічна лінія з виробництва ферментний препарат Галактолонгін Г10х працює 300 днів на рік та не потребує великої кількості робітників. Щодо розстановки чисельності, плануємо чисельність основних робітників (Чроб) – 10 осіб.

Розрахунок собівартості.

Розрахуємо собівартості виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

Складемо калькуляцію на 300 кг виробленої продукції.

Витрати за статтею «Сировина і основні матеріали» наведено у таблиці 1

Таблиця 4.1 Вартість «Допоміжні матеріали»

Назва	Норма витрат на 1 кг, гр	Норма витрат на 300 кг, гр	Ціна за 1 кг, тис. грн	Загальна вартість, грн
М'ясний екстракт	0,2	60	24	1440
Пептон з казеїну	0,2	60	19	1140
Дріжджовий екстракт	0,1	30	1,1	33
Двузамінний фосфат калію	0,04	12	0,18	2,16
Цитрат амонію	0,04	12	0,6	7,2
D-глюкоза	0,4	120	0,1	12
Твін	0,02	6	2	12
Ацетат натрію	0,1	30	0,1	3
Сульфат магнію	0,004	1,2	0,12	0,144
Сульфат марганцю	0,001	0,3	0,1	0,03
Хлорид марганцю	0,0035	1,05	0,12	0,126
Всього	-	-	-	2659,66

Витрати за статтею «Допоміжні матеріали» наведено у таблиці .2.

Таблиця 4.2 Вартість «Допоміжні матеріали»

Найменування	Кількість на 300 кг	Ціна за од., грн.	Загальна вартість, грн
металеві банки, 1 кг	300	20	6000

Витрати за статтею «Паливо і енергія на технологічні потреби» наведено у таблиці 3.

Таблиця 4.3 Вартість «Паливо і енергія на технологічні потреби»

Найменування	Одиниця вимірювання	Кількість на випуск	Ціна, грн	Загальна вартість, грн
Електроенергія	кВт/год	962	3,54	3406
Вода	м ³	210	35,16	7384
Всього	-	-	-	10790

Розрахуємо заробітну плату основним виробничим робітникам. Для виробництва 300 кг ферментного препарату Галактолонгін Г10х потрібна

оплата 8 годинного робочого дня робітника, плануємо оплату 40,46 грн за одну годину.

$$\text{Возп} = 40,46 * 8 = 323,68 \text{ грн.}$$

$$\text{На 300 кг} = 323,68 * 300 = 97104 \text{ грн.}$$

Витрати за статтею «Додаткова заробітна плата» складають 20% від основної заробітної плати:

$$\text{Вдзп} = 97104 * 0,2 = 19420,8 \text{ грн.}$$

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

$$\text{Всз} = (97104 + 19420,8) * 0,22 = 25635,5 \text{ грн.}$$

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

До витрат входять витрати на утримання, амортизацію, поточний ремонт обладнання та інструменту, утримання і ремонту обладнання, відшкодування зносу, інші витрати, що пов'язанні з утриманням та експлуатацією обладнання. За даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати: $97104 * 1 = 97104 \text{ грн.}$

Розрахуємо витрати за статтею «Загальновиробничі витрати», за даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати: $97104 * 1 = 97104 \text{ грн.}$

Виробнича собівартість складає суму перелічених витрат, яка дорівнює: $2659,66 + 6000 + 10790 + 97104 + 19420,8 + 25635,5 + 97104 + 97104 = 355817,96 \text{ грн.}$

Розрахуємо витрати за статтею «Адміністративні витрати», які плануємо 3 % від виробничої собівартості: $355817,96 * 0,03 = 10674,54 \text{ грн.}$

Розрахуємо витрати за статтею «Витрати на збут», які плануємо 2 % від виробничої собівартості: $355817,96 * 0,02 = 7116,36 \text{ грн.}$

Розрахуємо витрати за статтею «Інші операційні затрати», які плануємо 2 % від виробничої собівартості: $355817,96 * 0,02 = 7116,36 \text{ грн.}$

Повна собівартість на 300 кг готового продукту представимо у таблиці 4.4.

Таблиця 4.4 Повна собівартість 300 кг Галактолонгін Г10х

Статті витрат	Галактолонгін Г10х
1. Сировина і основні матеріали	2659,66
2. Допоміжні матеріали	6000
3. Паливо і енергія на технологічні цілі	10790
4. Основна заробітна платня виробничим працівникам	97104
5. Додаткова заробітна платня виробничим працівникам	19420,8
6. Відчислення на соціальні потреби	25635,5
7. Затрати на утримання і експлуатацію обладнання	97104
8. Загальновиробничі затрати	97104
Виробнича собівартість	355817,96
9. Адміністративні затрати	10674,54
10. Витрати на збут	7116,36
11. Інші операційні витрати	7116,36
Повна собівартість	380725,22

Розрахунок калькуляції собівартості 300 кг Галактолонгін Г10х показав, що повна собівартість складає 380725,22, собівартість на 1 кг складає $380725,22 / 300 = 1269,08$ грн.

За даними маркетингових досліджень було виявлено, що середня ціна складає в середньому на рівні 1200 – 2000 грн. за 1 кг.

Плануємо ціну ферментний препарат Галактолонгін Г10х за 1 кг – 1900 грн.

Таблиця 4.5 Розрахунок собівартості реалізованої продукції

Найменування Продукції	Річний обсяг виробництва, кг	Собівартість 1 кг, грн	Собівартість виробленої продукції, грн
1	2	3	4
ферментний препарат Галактолонгін Г10х	300	1269,08	380724

Розрахуємо обсяг виробленої продукції, яку планується виробляти (таблиця 4.6).

Таблиця 4.6 Розрахунок обсягу виробленої продукції

Найменування продукції	Обсяг продукції, г кг	Дійсна оптова ціна, тис. грн. за 1 кг	Обсяг виробленої продукції, тис. грн
1	2	3	4
ферментний препарат Галактолонгін Г10х	300	1900	570000

Розрахунок прибутку та чистого прибутку

Розрахуємо прибуток від виробництва та реалізації продукції ферментний препарат Галактолонгін Г10х.

Оподаткований прибуток від збільшення обсягу виробництва продукції визначимо за формулою:

$$\Pi = \text{ВП} - \text{С},$$

де Π – прибуток за рік, тис. грн.,

ВП – обсяг виробленої продукції, тис. грн.,

С – собівартість виробленої продукції, тис. грн.

$$\Pi = 570000 - 380724 = 189276 \text{ грн}$$

Розрахуємо чистий прибуток за формулою:

$$\text{ЧП} = \Pi - \Pi_{\text{п}},$$

де Π – оподаткований прибуток за рік, тис. грн.

$\Pi_{\text{п}}$ – податок на прибуток (на 01.01.2023 року – 18%).

$$\text{ЧП} = 189276 - 189276 \cdot 0,18 = 155206,32 \text{ грн. (155,21 тис. грн.)}$$

Розрахунок терміну окупності інвестицій

Розрахуємо термін окупності капітальних вкладень.

Термін окупності капітальних вкладень визначаємо за формулою:

$$T = I / \text{ЧП},$$

де I – інвестиції у проект, тис. грн.;

ЧП – чистий прибуток, тис. грн.

$$T = 726,11 / 155,21 = 4,67 \text{ року.}$$

З економічних розрахунків отримуємо термін окупності виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х – 4,67 років.

Таблиця 4.7 Техніко-економічні показники проекту виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х

Найменування показників	Значення показників
1. Виробнича потужність, кг	750
2. Обсяг виробленої продукції, кг	300
3. Обсяг виробленої продукції, тис. грн.	570
4. Собівартість виробленої продукції, тис. грн.	380,72
5. Оподаткований прибуток, тис. грн.	189,28
6. Чистий прибуток, тис. грн.	155,21
7. Чисельність працюючих, люд.	10
8. Середньорічний виробіток одного працівника, тис. грн.	57
9. Інвестиції, тис. грн.	726,11
10. Строк окупності інвестицій, років	4,67

ВИСНОВКИ

1. В результаті установки технологічної лінії для виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х обсяг виробленої продукції цеху складе 300 кг, що в грошовому виразі складає 570 тис. грн. Собівартість виробленої продукції складає 380,72 тис. грн. Прибуток після реалізації складає 189,28 тис. грн., з якого чистий прибуток складає 155,21 тис. грн. інвестиції у проект необхідні у сумі 726,11 тис. грн., строк окупності яких складе 4,67 року, що є у межах нормативного терміну.

2. Всі розраховані показники дозволяють стверджувати, що виробництво ферментного препарату Галактолонгін Г10х на комплексному біотехнологічному заводі є доходним та економічно вигідним.

РОЗДІЛ 5

ТЕХНИКА БЕЗПЕКИ НА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДПРИЄМСТВАХ

Безпека виробництва та застосування є невід'ємними вимогами до будь-якого технологічного процесу. Мірою безпеки на підприємстві служить вміст у повітрі приміщень і на поверхнях будь-яких потенційно небезпечних матеріалів. Об'єктами спостереження при вирішенні проблем виробничої безпеки є як робоче середовище, так і персонал. Тільки при благополучному стані зазначених об'єктів спостереження можна гарантувати, що прийняті заходи ефективні. Сказане рівною мірою відноситься також і до контролю всіх матеріальних потоків, що надходять з підприємства в навколишнє середовище.

5.1 Охорона праці

Ідентифікація небезпечних та шкідливих виробничих факторів, які мають найбільший вплив на працюючих

За своїм походженням та природою дії НШВФ можна поділити на 5 груп: фізичні, хімічні, біологічні, психофізіологічні та соціальні.

До фізичних НШВФ відносяться машини та механізми або їх елементи, а також вироби, матеріали, заготовки тощо, які рухаються або обертаються; конструкції, які руйнуються; системи, устаткування або елементи обладнання, які знаходяться під підвищеним тиском; підвищена запиленість та загазованість повітря; підвищена або понижена температура повітря, поверхонь приміщення, обладнання, матеріалів; підвищені рівні шуму, вібрації, ультразвуку, інфразвуку; підвищений або понижений барометричний тиск та його різкі коливання; підвищена та понижена вологість; підвищена швидкість руху та підвищена іонізація повітря; підвищений рівень іонізуючих випромінювань; підвищене значення напруги в електричній мережі; підвищені рівні статичної електрики, електромагнітних випромінювань; підвищена напруженість електричного, магнітного полів; відсутність або нестача світла; недостатня освітленість робочої зони; підвищена яскравість світла; понижена

контрастність; прямий та віддзеркалений блиск; підвищена пульсація світлового потоку; підвищені рівні ультрафіолетової та інфрачервоної радіації; гострі кромки, задирки, шершавість на поверхні заготовок, інструментів та обладнання; розташування робочого місця на значній висоті відносно землі (підлоги); слизька підлога; невагомість.

До хімічних НШВФ відносяться хімічні речовини, які по характеру дії на організм людини поділяються на токсичні, задушливі, наркотичні, подразнюючі, сенсibiliзуючі, канцерогенні, мутагенні та такі, що впливають на репродуктивну функцію. По шляхам проникнення в організм людини вони поділяються на такі, що потрапляють через:

- 1) органи дихання;
- 2) шлунково-кишковий тракт;
- 3) шкіряні покриви та слизисті оболонки.

До біологічних НШВФ відносяться патогенні мікроорганізми (бактерії, віруси, рикетсії, спірохети, грибки, найпростіші) та продукти їхньої життєдіяльності, а також макроорганізми (тварини та рослини).

До психофізіологічних НШВФ відносяться фізичні (статичні та динамічні) перевантаження і нервово-психічні перевантаження (розумове перенапруження, перенапруження аналізаторів, монотонність праці, емоційні перевантаження).

Соціальні НШВФ – це неякісна організація роботи, понаднормова робота, необхідність роботи в колективі з поганими відносинами між його членами, соціальна ізоляваність з відривом від сім'ї, зміна біоритмів, незадоволеність роботою, фізична та/або словесна образа та її ризик, насильство та його ризик.

У проєктованому цеху з виробництва ферменту рибофлавіну встановлено наступне обладнання:

1. Ферментер
2. Посівний апарат
3. Центрифуги

4. Ферментер
5. Посівний апарат
6. Центрифуги
7. Електродвигуни
8. Фільтри для очистки повітря
9. Реактор
10. Ємність з мішалкою
11. Вакуум-випарна сушарка

У процесі роботи виникає ряд потенційно небезпечних і шкідливих виробничих факторів: фізичні, хімічні, біологічні й психофізіологічні (згідно Державних санітарних норм і правил [64], які показані у табл.5.1

Таблиця 5.1- Небезпечні і шкідливі виробничі фактори, нормоване значення, нормативний акт, джерело виникнення та можливі наслідки від їх дії

№ з/п	Найменування небезпечних і шкідливих виробничих факторів	Нормоване значення	Нормативний акт	Джерело виникнення
1	2	3	4	5
1	Рухливі машини і механізми	-	НПАОП 15.3-1.19-98	рух транспортних засобів, електрокарів, візків
2	Рухливі частини обладнання, які пересувають вироби	-	-//-	конвеєри
3	Підвищена запиленість повітря робочої зони	ГДК (солі)=6 мг/м ³ ГДК (оцт. к-та)=5 мг/м ³	Гігієнічні нормативи ГН 2.2.5.686-98	відділення розпакування та просіювання
4	Підвищена температура повітря робочої зони	Холодний період: 19-21 Теплий період: 21-23	ДСН 3.36.042-99	ферментер, посівний апарат, інокулятор
5	Підвищений рівень шуму на робочому місці	80 дБА	ДСН 3.3.6.037-99 санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку	ферментер, посівний апарат, інокулятор, електродвигуни, сепаратор
6	Підвищений рівень	50/76 дБ	ДСН 3.3.6.039-99	ферментер, посівний апарат,

	вібрації		санітарні норми виробничої загальної та локальної вібрації	інокулятор, електродвигуни, сепаратор
7	Підвищена вологість	40 – 60 %		ферментер, посівний апарат, інокулятор
8	Підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання	-	НПАОП 40.1-1.01-97 40.1-1.32-01	ферментер, посівний апарат, інокулятор, електродвигуни, сепаратор, при роботі електричного устаткування
9	Підвищений рівень статичної електрики	-	НПАОП 40.1-1.01-97 Правила безпечної експлуатації електроустановок 40.1-1.32-01	електродвигуни, сепаратор, при роботі електричного устаткування
10	Недостатня освітленість робочої зони	КПО $\geq$ 1,5 %	ДБН В.2.5-28-2006 природне і штучне освітлення	ферментер, посівний апарат, інокулятор, електродвигуни, сепаратор
11	Гострі краї, задирки і шорсткість	-	НПАОП 15.3-1.19-98	на поверхнях заготівель, устаткування
12	Розташування робочого місця на значній висоті	-	НПАОП 15.3-1.19-98	ферментер, посівний апарат, інокулятор, сепаратор,
13	Подразнюючі	ГДК (солі)=6 мг/м ³ ГДК (оцт. к-та)=5 мг/м ³	Гігієнічні нормативи ГН 2.2.5.686-98	ферментаційне відділення, лабораторія, відділення приготування дезрозчинів
14	Патогенні мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності	Не допускаються	I 4.4.4.077-01	ферментаційне відділення, лабораторія
15	Фізичні перевантаження	-	-	ферментер, посівний апарат, інокулятор, електродвигуни, сепаратор
16	Монотонність праці	-	Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 08.04.2014 № 248	ферментер, посівний апарат, інокулятор, електродвигуни, сепаратор

5.2 Екологічна безпечність виробництва

Визначення і нормування показників мікроклімату робочої зони

Для забезпечення нормованих показників повітряного середовища в робочій зоні на підприємстві передбачені оптимальні норми температури, відносної вологості, швидкості руху повітря представлені у табл.5.2:

Таблиця 5.2 - Виробниче приміщення, період року, категорія роботи, що виконується, температура, відносна вологість, швидкість руху повітря(за ДСН 3.36.042-99) [65]

№ з/п	Найменування виробничого приміщення	Період року	Категорія роботи, що виконується	Температура, °С (оптимальна)	Відносна вологість, % (оптимальна)	Швидкість руху повітря, м/с (оптимальна)
1	Ферментаційне відділення	Холодний	Середньої важкості Па	18 – 20	40 - 60	0,2
2	Ферментаційне відділення	Теплий	Середньої важкості Па	21 – 23	40 - 60	0,3

Виробничі приміщення обладнані вентиляцією. Технологічний процес забезпечений приточно-витяжною вентиляцією, місцевими відсосами.

Мікроклімат робочої зони для створення комфортних та безпечних умов забезпечується за рахунок вентиляції, кондиціювання повітря, дистанційного управління технологічним обладнанням, спец. одягу, засобів індивідуального захисту, медичного огляду.

Виявлення джерел виробничого шуму і вібрації та їх нормування

Для зниження рівня шуму найбільш гучні виробництва виділяють в окремі приміщення звукоізолюючими стінами (компресорна, сепаратори, т.і.). Передбачено установку всього шумного обладнання на спеціальний фундамент; прямозубі зубчасті передачі замінені більше плавними передачами; своєчасний огляд за устаткуванням і його ремонт. Гранично допустимий рівень шуму на постійних робочих місцях - не більше 80 дБА

згідно ДСН 3.3.6.037-99 та ДСН 3.3.6.039-99 [64-65]. Для робітників передбачені навушники.

Таблиця 5.3 - Технологічне обладнання, фактичне значення шуму, нормативне значення шуму, фактичне значення вібрації (локальна/загальна), нормативне значення вібрації (локальна/загальна)

№ з/п	Найменування одиниці технологічного обладнання	Нормативне значення шуму, дБА	Нормативне значення вібрації (локальна/загальна), дБ
1	Ферментер	80	50/76
2	Посівний апарат	80	50/76
3	Інокулятор	80	50/76
4	Центрифуга	80	50/76
5	Електродвигуни	80	50/76
6	Фільтри для очищення повітря	80	50/76
7	Гранулятор	80	50/76
8	Реактор змішувач	80	50/76

Виділення і нормування показників освітлення робочої зони

Виробничий цех має природне та штучне освітлення згідно ДБН В.2.5.-28-2006 [66].

Природна освітленість у проєктованому цеху рівномірна за рахунок віконних прорізів. Використовується бічне та суміщене освітлення. Бічне - денне світло проникає в приміщення через світлові прорізи в зовнішніх стінах будинку; сполучене - одночасно використовується природне й штучне світло. Засклені поверхні світлових прорізів очищають не рідше 1 раз у квартал.

Для штучної освітленості використовують електричні джерела світла. Передбачено робоче, аварійне й ремонтне освітлення. При неполадках і відключенні світла на виробництві застосовується аварійна освітленість для продовження роботи.

Проектом передбачений необхідний рівень освітленості, наведений у табл. 5.4

Таблиця 5.4 - Виробниче приміщення, вид освітлення, найменший розмір об'єкта розрізнення, розряд та під розряд зорової роботи, нормоване значення КПО, нормоване значення освітленості

№ з/п	Виробниче приміщення	Вид освітлення	Розряд та підрозряд зорової роботи	Освітленість, лк min
1	Ферментаційне відділення	Суміщене	<i>УШБ</i>	100
2	Лабораторія	Суміщене	<i>ШБ</i>	300
3	Відділення приготування дезрозчинів	Суміщене	<i>Шг</i>	200
4	Трансформаторна	Суміщене	<i>Шг</i>	200
5	Щитова	Суміщене	<i>Ув</i>	200
6	Склад готової продукції	Суміщене	<i>Ув</i>	200
7	Склад миючих засобів та дезрозчинів	Суміщене	<i>Шг</i>	200
8	Відділення оформлення та упакування готової продукції	Суміщене	<i>Ув</i>	200

Вимоги безпеки щодо розташування та компонування виробничого обладнання

Розташування та компонування основного і допоміжного технологічного обладнання відповідає вимогам.

Мінімальна ширина магістральних проходів – 1,5 м.

Найменша відстань поміж стінами виробничої будівлі і обладнання – 1,0 м. При наявності постійних робочих місць між ними – 1,4 м.

Ширина проходів між обладнанням у вибухонебезпечних приміщеннях – не менш ніж 1,5 м.

Мінімальна ширина проходу між паралельно встановленим виробничим обладнання – 2 м, а відстань між окремо розташованим обладнанням – 0,8 м.

Для запобігання травматизму, пов'язаного з роботою устаткування для транспортування та інспекції, зміст і ремонт даного встаткування відповідає вимогам.

При обслуговуванні лінії оформлення готової продукції дотримуються наступні заходи безпеки, що запобігають шкідливому впливу механізмів, що рухаються: передбачені огороження, блокування, контроль над рівномірністю надходження продукції на лінію.

Для запобігання травматизму при розміщенні робочого місця на висоті передбачені сходи з поручнями шириною 1 м і проходи між устаткуванням і поручнями 1 м.

Електробезпека

Безпека від електричного струму забезпечується за допомогою наступних дій: струмоведучі частини устаткування ізолюються, деякі мають подвоєну ізоляцію (мийні машини); передбачене заземлення електродвигунів, автоматичне захисне відключення, попереджувальна сигналізація; усі виробничі приміщення класифіковані за категоріями табл. 5. Робітники забезпечені засобами захисту: діелектричні килимки біля розподільних щитів.

Електродвигун конвеєра із пристроєм, що обполіскує, закритий і має обдуб. Електропроводка прокладається в гумових трубах, захищається від механічного ушкодження, нагрівання вологи.

Для запобігання травматизму від статичної електрики заземлене все устаткування. Насоси, реактори, пневмотранспорт відділені та заземлені окремо. Виробничі та допоміжні приміщення, категорія приміщень за

чинниками виробничого середовища, категорія приміщень з небезпеки ураження електричним струмом наведені у табл. 5.5.

Таблиця 5.5 - Виробничі та допоміжні приміщення, категорія приміщень за чинниками виробничого середовища, категорія приміщень з небезпеки ураження електричним струмом [65-66]

№ п.п.	Виробничі та допоміжні приміщення	Категорія приміщень за чинниками виробничого середовища	Категорія приміщень з небезпеки ураження електричним струмом
1	2	3	4
1	Ферментаційне відділення	вологе	I
2	Лабораторія	сухе	I
3	Відділення приготування дезрозчинів	вологе	I
4	Трансформаторна	сухе	II
5	Щитова	сухе	II
6	Склад готової продукції	сухе	I

Примітка: I – приміщення без підвищеної небезпеки; II - приміщення з підвищеною небезпекою.

Визначення категорії приміщень з пожежовибухонебезпеки та класу можливих пожеж

Пожежна безпека відповідає вимогам стандартів, будівельних норм і правил, норм технологічного проектування [67].

До всіх будинків і споруджень забезпечений вільний доступ. У нічний час територія висвітлюється. Забороняється паління в невстановлених місцях.

Технологічне устаткування при нормальних режимах роботи пожегобезпечне, а на випадок небезпечних несправностей і аварій передбачаються захисні заходи, що обмежують масштаб і наслідки пожежі.

Класифікація виробничих приміщень за категоріями вибухопожежної і пожежної небезпеки представлена в табл. 5.6.

Таблиця 5.6 - Виробничі та допоміжні приміщення, категорія приміщень з пожежовибухонебезпеки, клас пожеж, клас зони з пожежовибухонебезпеки

№ з/п	Виробничі та допоміжні приміщення	Категорія приміщень з пожежовибухонебезпеки	Клас пожеж	Клас зони з пожежовибухонебезпеки
1	Ферментаційне відділення	Д	А, В, Е	П-1
2	Лабораторія	В	А, В, С, Е	П-1
3	Відділення приготування дезрозчинів	В	А, В, Е	П-1
4	Трансформаторна	Д	Е	П-1
5	Щитова	Д	Е	П-1
6	Склад готової продукції	В	А	П-1

Примітка: Категорія В. Горючі та важкогорючі рідини, тверді горючі та важкогорючі речовини і матеріали. Категорія Д. Негорючі речовини та матеріали в холодному стані. Клас П-І — це приміщення, де є горючі рідини з температурою спалаху парів понад 61°C.

Засоби пожежогасіння

Гранична площа захисту від пожежі складає 1800 м² для приміщень категорії Д, 400 м² - для приміщень категорії В. Бочки з водою встановлюються на території підприємства. На входу у цех встановлений один пожежний щит, що включає в себе вогнегасник, відро, лопату, багри, ящик із сухим піском.

В залежності від категорії приміщення з пожежовибухонебезпеки та класу можливих пожеж, передбачені наступні засоби пожежогасіння:

- Пожежні сповіщувачі: ручні – кнопка; автоматичні – теплові.
- Переносні вуглекислотні вогнегасники марки ОУ-5 в кількості 8 шт. та переносні порошкові вогнегасники марки ОП-5 в кількості 8 шт. Встановлені у виробничому цеху 3 вогнегасники марки ОУ-5 та 3 - марки ОП-5), у відділенні оформлення та упакування готової продукції (2

вогнегасники марки ОУ-5 та 2 - марки ОП-5), на складі готової продукції (3 вогнегасники марки ОУ-5 та 3 - марки ОП-5).

- Система пожежогасіння: внутрішня – від пожежних кранів, встановлених на мережі внутрішнього протипожежного водопроводу; зовнішня – від пожежних гідрантів, встановлених на зовнішній мережі протипожежного водопостачання.

6.2 Охорона навколишнього середовища

Обов'язок забезпечити безпеку персоналу підприємств повинна супроводжуватися такими ж заходами щодо захисту всіх інших людей від якого б то не було впливу всіх видів відходів, що утворюються на підприємстві. Повітря, що відводиться, має бути піддано фільтрації і контролюватися на чистоту. Для заміни фільтрів і їх знешкодження повинні бути розроблені безпечні процедури. Контроль за викидами шкідливих речовин в атмосфері відбувається згідно ДСП-201-97. Тверді відходи підлягають автоклавуванню, а потім зазвичай викидаються на звалище. Охорона ґрунту від забруднень повинна відповідати СанПіН 42-128-49-690.

Обробка рідких відходів частково визначається місцем розташування підприємства. Місцеві інструкції регламентують головним чином такі фактори, як сприятливе біологічне споживання кисню і заходи по виключенню зі стоків солей, що володіють, наприклад, корозійною дією. Присутність в стічних водах мікробних клітин не обов'язково буде являти собою небезпеку, так як вміст їх в звичайних стічних водах буває досить високим. Однак окремі види або навіть штами мікроорганізмів можуть виявитися небезпечними або незвичайними для побутових стоків даного району. Стічні води після очищення повинні відповідати вимогам СанПіН 4630 [52]. Вплив же на характер стоків і на їх безпеку (або небезпеку) таких факторів, як внутрішньоклітинні матеріали і ендотоксини, з'ясовано поки тільки частково.

ВИСНОВКИ

1. Дипломну роботу присвячено розробці біотехнології виробництва гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю. Результатом роботи є розробка нормативної документації і впровадження технології виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

2. Вивчено динаміку росту культури *Bifidobacterium longum* на різних живильних середовищах і обрано оптимальне живильне середовище для подальшого культивування даної культури. Було виявлено, що оптимальними за накопиченням біомаси є середовище MRS.

3. Вивчено вплив різних фізико-хімічних чинників на активність α -галактозидози. α -галактоїдаза з *B.longum* проявляє максимальну активність при $T = 33-48\text{ }^{\circ}\text{C}$ та $\text{pH } 6,0$. Фермент є стабільним у діапазоні $\text{pH } 6,0$.

4. Проведено ідентифікацію каталітично функціональних груп активного центра α -галактозидози. Показано, що в каталітичному центрі α -галактозидози наявні дві функціональні групи – карбоксильна й імідазольна, що утворюють систему карбоксилат-імідазолій, яка функціонує за типом кислотно-основного каталізу. Запропоновано механізм розриву α -1,6-глікозидного зв'язку в галактоолігосахариді рафінозі.

5. Складено матеріальний баланс виробництва α -галактозидози на основі продуцента *Bifidobacterium longum*.

6. Створено технологічну схему виробництва α -галактозидози, на основі продуцента *Bifidobacterium longum*.

7. Розроблено принципову технологічну схему виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

8. У проекті передбачено всі необхідні вимоги щодо охорони праці та охорони навколишнього середовища.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. V.H.Mulimani and S.Devendra. Effect of soaking, cooking and crude α -galactosidase treatment on the oligosaccharides content of red gram flour.//Food Chemistry.- 1998.No.4, p.475-479.
2. Church F.C., Meyers S.P. and Srinivasa,V.R. Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii*. In Developments in Industrial Microbiology ed. Underkofler, L.A. and Wulf, M.L. Arlington, V.A Society for Industrial Microbiology.Vol.21,Ch.35.p.339-348.
3. Edsall J., Neuruth H., Walley K.Proteins.N-Y: Acad. Press, 1958.-V.1.-P990.
4. Pujari V., Chandra T.S. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of α -galactosidase // Bioprocess Engineering. 2010. V. 23. P. 3003-307
5. Gavrilescu M., Chisti Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry // Biotechnology advances. 2005. T. 23. –№. 7-8.14
6. Liu S, Hu W, Wang Z, Chen T. Production of α -galactosidase and related cofactors by biotechnological processes. Microb Cell Fact. 2020 Feb 13;19(1):31. doi: 10.1186/s12934-020-01302-7. PMID: 32054466; PMCID: PMC7017516.
7. Demain, Arnold. (1999). Demain, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 455-463. Applied microbiology and biotechnology. 52. 455-63. 10.1007/s002530051546.
8. Thakur K, Tomar SK, Singh AK, Mandal S, Arora S. A-galactosidase and health: A review of recent human research. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017 Nov 22;57(17):3650-3660. doi: 10.1080/10408398.2016.1145104. PMID: 27029320.
9. Revuelta J. L., Buitrago M. J., Santos M. A., Inventors; BASF AG, Assignee. Synthesis of α -galactosidase. 1995
10. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. -М.:Мир,1982.-Т.1.-С.234-235.
11. Кочетов Г.А. Тиминовые ферменты. -М.:Наука,1974.-С.74.
12. Полянский О.Л. Ферменты. -М.:Мир,1984.-С.101-117.
13. Красиков В.В., Карелов Д.В., Фирсов Л.М. α -галактозидазы // Биохимия. -2001.- Вып.3.-С.332-348.
14. Решетило Л. І. Мікроорганізми як продуценти рибофлавіну Вісник Львівського торговельно-економічного університету. Технічні науки. № 23, 2020. С. 116-120.
15. Основы биотехнологии: учебник для студ. Освітнього рівня бакалавр спец. «Біологія»/ уклад. Н. Ю. Мацай. – Луганськ: Держ. Закл. «Луган. Нац. Ун-т імені Тараса Шевченка». Луганськ: Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. 153 с.
16. Goulas T., Goulas A., Tzortzis G., Gibson G.R. A novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties, gene molecular cloning and heterologous expression // Appl Microbiol Biotechnol. – 2009. - № 82. – p. 471-477.
17. O’Connell K.J., O’Connell Motherway M., O’Callaghan J., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Ventura M., Stanton C., van Sinderen D. Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003 // Appl. Environ Microbiol. – 2013. - №79. – p. 6280-6292.
18. Варбанец Л.Д., Борзова Н.В. Использование методов химической модификации для стабилизации грибных гликозидаз // «Біотехнологія». – 2011. - Т. 4. - № 6. – с. 36-41.
19. Underkofler L.A., Wulf M.L. Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii* // Society for Industrial Microbiology. – 2000. – Vol. 21, Ch.35.– P.339-348.

20. Taborda, P. C. α -Galactosidases: characteristics, production and immobilization / P. C. Taborda, L. A. Cardoso, S. G. Karp // J. Food Nutr. Res. – 2016. – Vol. 55. – P. 195–204.
Рис. 6. Продукция α -галактозидазы *B. adolescentis* Cf-G в зависимости от источника углерода в среде культивирования.
21. Митропольська Н.Ю., Бухало А.С., Маланчук В.М., Буглова Т.Т., Качуровська В.П. α -Галактозидазна активність в культурах вищих BasidiomycetesJ/Укр. ботан. журн. - Київ: Наукова думка - 1990. - 47, № 5. -С. 56-59.
22. Буглова Т. Т., Маланчук В.М., Элланская И.А., Зайченко А.М., Захарова И.Я. Физиолого-биохимические особенности продуцентов α -галактозидазы. //Микробиол. журн. -1991. 53, № 6 С. 34-41.
23. Буглова Т.Т., Маланчук В.М., Захарова И.Я., Элланская И.А., Кульман Р.А. Выделение, очистка и некоторые свойства грибной α -галактозидазы. //Микробиол. журн. - 1994. - 54, № 4. С. 3-11.
24. Буглова Т.Т., Маланчук В.М. Влияние температуры и pH на активность грибной α -галактозидазы //Микробиол. журн. 1995. -57, № 1 С. 43-48. Malanchuk V.M, Buglova T.T., Varbanets L.D., Zakharova I.Ya, Kuhlmann R.A., Likhoshesterov L.M., Martynova MD. Substrate specificity of α -galactosidase from *Penicillium* sp.23 //Микробиол. журн. - 1999. - 61, № 1. -Р. 74-79.
25. Маланчук В.М., Буглова Т.Т., Варбанец Л.Д., Захарова И.Я. Исследование функциональных групп в активном центре α -галактозидазы *Cladosporium cladosporioides* 189 //Микробиол. журн. - 2000. - 62, № 4. С. 9-20.
26. Буглова Т. Т., Еланська І.О., Маланчук В.М., Захарова І.Я., Жданова Н.М., Кульман Р.А., Соколова Е.В., В'юницька В.О. Спосіб одержання α -галактозидази /Патент України № 10512 А. -1996. - 9 с.
27. Буглова Т. Т., Маланчук В.М., Элланская И.А., Соколова Е.В., Артышкс Л.В., Писарчук Е.Н., Нагорная С.С., Колесова Е.А. Скрининг внеклеточн α -галактозидазы и α -N-ацетилгалактозаминидазы среди микроорганизм различных групп. //Редкол. “Микробиол. журн.” - Киев, 1990. - 17 с. - Деп. ВИНТИ 07.05.90, № 2360-В 90.
28. Буглова Г. Т., Маланчук В.М., Элланская И.А., Захарова И.Я., Цибин М, Оптимизация состава среды и условий культивирования продуцентов галактозидазы. //Редкол. “Микробиол. журн.” - Киев, 1993. - 13 с. - Деп ВИНТИ 28.04.93, № Ц45-В 93.
29. Буглова Т. Т., Маланчук В.М., Элланская И.А., Соколова Е.В. Внеклеточі α -галактозидаза мікроміцетів. //Тезиси докл. На Всес. конф. “Мето, получения, анализа и применения ферментов” - Юрмала -1990. - С. 92.
30. Ludmila D. Varbanets, Valentina M. Malanchuk, Tatjana T, Buglova. Fungal galactosidase catalyzing hydrolysis of glycopolymers terminal α -D-link galactose. //XIX International Carbohydrate Symposium. San Diego, Califom August 4-14, 1998, P. 211. University of California San Diego.
31. Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., & Tekutyeva, L. A. (2020). Production of α -galactosidase by Microorganisms: An Overview. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 570828.
32. Тимошенко Л.В., Чубик М.В., Пестряков А.Н. Основы микробиологии и биотехнологии. – Томск: Томский политехнический университет, 2011. 194 с.
33. Gavrilescu M., Chisti Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry // *Biotechnology advances*. 2005. Т. 23. –№. 7-8.14.
34. Pujari V., Chandra T.S. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of α -galactosidase // *Bioprocess Engineering*. 2010. V. 23. P. 3003-307.

35. Захарова И.Я., Буглова Т.Т., Тихомирова А.С. Ферменты трансформирующие галактозу. К.:Наукова думка.-1988.-230с.
36. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Терычная Т.А. О механизме каталитического действия карбогидраз // Прикладная биохимия и микробиология.-1999.-№2.-С.123-132.
37. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. -М.:Наука,1985.-С.536.
38. Гааль.Э., Меджьеши Г., Верецкая Л.С. Электрофорез в разделении макромолекул .- М.: Наука,1982.-С.446.
39. Хорлин А.Я. Структура и функции активних центров ферментов.-М,1974-С.39-69.
40. Радченко М. М., Бейко Н. Є., Андріяш Г. С., Тігунова О. О., Шульга С. М Виділення та Ідентифікація штаму-продуценту α -галактозидози 2019. Том 24. С. 154-159.
41. Schwechheimer SK, Park EY, Revuelta JL, Becker J, Wittmann C. Biotechnology of alpha-galactosidase Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Mar;100(5):2107-19.doi: 10.1007/s00253-015-7256-z. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26758294.
42. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост. А.П. Асташкина; Томский политехнический университет. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.
43. Живильні середовища. Класифікація їх за призначенням, походженням, складом. Основні вимоги до живильних середовищ [Електроний ресурс].-Режим доступу до ресурсу: <http://um.co.ua/8/8-15/8-153472.html>
44. Підготовка поживних середовищ середовищ [Електроний ресурс].-Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/7443249/page:10>
45. Асептика біотехнологічних виробництв/ Головей О.П. Гуляєв В.М.// Кам'янське,2017.- 139с.
46. Основы проектирования предприятий микробиологической промышленности/Кантере В.М., Мосичев М. С., Дорошенко М. И. и рд.: - Учеб. Пособие для вузов. – М.: Агропромиздат. 1990. – 304 с.
47. Вимоги до опалення, вентиляції та кондиціонування повітря виробничих, навчальних та побутових приміщень [Електроний ресурс].-Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/5298402/page:32/>
48. Вимоги до опалення, вентиляції та кондиціонування повітря виробничих, навчальних та побутових приміщень [Електроний ресурс].-Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/5298402/page:32/>
49. Санітарні вимоги до території, водопостачання та каналізації приміщень [Електроний ресурс].-Режим доступу до ресурсу: <http://medbib.in.ua/sanitarnyie-trebovaniya-territorii.html>
50. Конституція України: N 528 від 27.12.2001 // відомство Верховної Ради. Київ: Міністерство охорони здоров'я України, 2006, 42 с.
51. ДСН 3.36.042-99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.
52. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку.
53. ДСН 3.3.6.039-99. Санітарні норми виробничої загальної та локальної вібрації.

54. ДБН В.2.5.-28-2006. Природне і штучне освітлення.
55. НПАОП 40.1-1.01-97. Правила безпечної експлуатації електроустановок.
56. НПАОП 40.1-1.32-01. Правила будови електроустановок. Електрообладнання спеціальних електроустановок.
57. Основы проектирования производств в химико-фармацевтической промышленности: Учебник для студ.вузов / В.И.Чуешов, Л.А.Мандрыка, А.А.Сичкарь, П.Д.Пашнев, Л.М.Винник.- Харьков: Вид-во НФаУ, 2004.- 460 с.
58. Євдін О.М., Могильченко В.В та ін.. Захист населення територій від надзвичайних ситуацій. Т.1. «Техногенна та природна небезпека». Т.3 «Інженерно- технічні заходи цивільного захисту (цивільної оборони) та містобудування». Посібник – К: КІМ, 2007, 2008- 636 с, -152 с.
59. ДСП-201-97. «Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць» (від забруднення хімічними та біологічними речовинами).
60. СанПиН 42-128-49-690 «Санитарные правила содержания территорий населенных мест».
61. СанПіН 4630 «Санітарні правила та норми охорони поверхневих вод від забруднення».
62. Каталог. Бактериологические среды для санитарной и клинической микробиологии, биотехнологии и контроля лекарственных средств. Государственный научный центр прикладной микробиологии. Отделение "Питательные среды". - Оболенск, 1999.
63. Умовия культивування бактерій [Електроний ресурс].- Режим доступу: <https://studfile.net/preview/4104311/page:35/>
64. Способи культивування мікроорганізмів [Електроний ресурс].-Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193874/page:14/>
65. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов : методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост. А.П. Асташкина ; Томский политехнический университет. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.
66. Вимоги до опалення, вентиляції та кондиціонування повітря виробничих, навчальних та побутових приміщень [Електроний ресур].-Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/5298402/page:32/>
67. Санітарні вимоги до території, водопостачання та каналізації приміщень [Електроний ресур].-Режим доступу до ресурсу: <http://medbib.in.ua/sanitarnyie-trebovaniya-territorii.html>