

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БІОХІМІЇ, МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ФІЗІОЛОГІЇ
ХАРЧУВАННЯ



ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА

до кваліфікаційної роботи бакалавра

на тему: «УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ

β - ГЛЮКАНАЗИ»

Здобувач
студент 4-го курсу,
групи Біо-48

В.В.Іванов

Керівник
доц. кафедри БМтаФХ

О.О Килименчук

Дипломний проєкт допускається до захисту

Рішення кафедри від 31.05. 2023 р., протокол № 9

Зав. кафедри БМтаФХ

Л.В. Капрельянц

Одеса – 2023

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»
Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БМтаФХ

_____ Л.В. Капрельянц

«___» _____ 2023 р.

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Іванова Владислава Володимировича

1.Тема дипломного проєкту «Удосконалення технології отримання β - глюканази», затверджена наказом вищого навчального закладу від «13» вересня 2022 року №565-03

2. Термін здачі здобувачем закінченої роботи 25 травня 2023 року

3.Вихідні данні до роботи «Удосконалення технології отримання β - глюканази» :

<i>Потужність підприємства в умовних тонах на рік ($G_{\text{УТ}}$)</i>	50
<i>Кількість робочих днів у рік ($T_{\text{РД}}$)</i>	308
<i>Стандартна активність препарату, од./г ($A_{\text{СТ}}$)</i>	3500

4. Перелік питань, які потрібно розробити: Обґрунтувати потребу у препараті, зробити аналіз літератури щодо продуцентів β - глюканази, технологій їх отримання, складу поживних середовищ; провести технологічні розрахунки; описати особливості удосконаленої технології; провести аналіз інвестиційної привабливості проєкту; надати висновки та рекомендації; навести список літератури;

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) : Лист 1 – Постадійна схема технології отримання β – глюканази. Лист 2 – Апаратурна схема технології. Листи 3,4 – Основні апарати, що застосовані у даній технології.

6. Консультанти розділів дипломного проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Технологічна частина	Килименчук О.О., доц.	02.02.2023	25.05.2023
Охорона праці та навколишнього середовища	Велічко Т.О., доц.	28.04.2023	19.05.2023
Економічні розрахунки	Крупіна С.В., доц.	28.04.2023	19.05.2023

7. Дата видачі завдання « 02 » 02 2023 р.

Керівник _____ Килименчук О. О.

Завдання прийняв
до виконання _____ Іванов В. В.

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 _____ Іванов В.В

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Узгодження дипломного проєкту з керівником	01.09.2022-10.09.2022	Виконав
2.	Огляд літератури за темою дипломного проєкту	02.02.2023-27.02.2023	Виконав
3.	Анотація. Розділ 1 «Огляд літератури»	28.02.2023-20.03.2023	Виконав
4.	Розділ 2 «Техніко-економічне обґрунтування технології»	28.02.2023-31.03.2023	Виконав
5.	Розділ 3 «Опис технології отримання β – глюканази ».	03.04.2023-28.04.2023	Виконав
6.	Розділ 4 – «Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс біосинтезу». Підбір обладнання, опис удосконаленої технології отримання β – глюканази. Виконання графічної частини.	03.04.2023-28.04.2023	Виконав
7.	Розділ 5 «Охорона праці та навколишнього середовища»	28.04.2023-19.05.2023	Виконав
8.	Розділ 6 « Економічні розрахунки» Висновки.	28.04.2023-19.05. 2023	Виконав
9.	Оформлення дипломного проєкту та його презентації. Перевірка роботи керівником.	22.05.2023-26.05.2023	Виконав
10.	Попередній захист дипломного проєкту	26.05.2023-30.05.2023	Виконав
11.	Захист дипломного проєкту	20.06.2023	Згідно графіку

Здобувач _____ Іванов Владислав Володимирович

Керівник роботи _____ Килименчук Олена Олександрівна

ЗМІСТ

Анотація	6
Annotation	7
Перелік умовних позначень	8
Вступ	9
Розділ 1. Огляд літератури	11
1.1 Значення геміцелюлазних ферментів у народному господарстві	12
1.2 Класифікація, просторова структура та механізм дії β – глюканаза на глюкан	13
1.2.1 Класифікація β – глюканаза	13
1.2.2 Просторова структура та механізм дії β – глюканаза на глюкан	16
1.3 Фізико-хімічні властивості ендо--(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканаза	19
1.4 Області застосування ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканаза	19
1.5 Області застосування ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканаза	20
Розділ 2 Техніко економічне обґрунтування технології	25
2.1 Виробництво ферментів в Україні та потреба на ринку β - глюканаза	25
2.2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	29
2.3 Обґрунтування вибору біологічного агента	30
2.3.1 Характеристика біологічного агента - продуцента β - глюканаза	30
2.3.2 Розмноження мікроміцетів роду <i>Trichoderma</i>	35
Розділ 3 Опис технології одержання β - глюканаза	37
3.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва	37
3.2 Біосинтез β - глюканаза та вплив основних факторів і параметрів на цей процес	39
3.2.1 Поживні середовища для культивування ферментів глюканаза	41
3.2.2 Отримання препаратів з глибинних аеробних культур	43
3.2.3 Виділення ферментів	44
3.2.4 Отримання товарних форм	47
Розділ 4 Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс біосинтезу	54
4.1 Продуктовий розрахунок виробництва ФП β - глюканази Г20Х потужністю 50 умов. тонн на рік	54
4.2 Матеріальний баланс на одну ферментацію (партію)	62
4.3 Розрахунок технологічного обладнання	65
4.4 Зведена таблиця результатів розрахунку	67
4.5 Наукові дослідження	70
4.6 Викладення удосконаленого технологічного процесу (загальні вимоги)	75
4.7 Схема постадійного контролю біосинтезу β - глюканази з <i>Trichoderma reesei</i>	83
Розділ 5. Охорона праці і навколишнього середовища	87
5.1 Виробничі фактори, що впливають на навколишнє середовище при виробництві ферментів	87
5.2 Методи очищення стічних вод при виробництві ферментів	88
5.2.1 Механічні методи усунення забруднень	88
5.2.2 Фізико-хімічні методи усунення забруднень	89
5.2.3 Біологічні методи усунення забруднень	89
5.2.4 Заходи щодо поліпшення впливу виробництва ферментів на організм людини	92
Розділ 6. Економічні розрахунки	95
6.1 Маркетингове дослідження ринку ферментів	96
6.2 Техніко економічне обґрунтування потреби у препараті β - глюканази	98
6.3 Розрахунок економічної ефективності проєкту	99
6.3.1. Розрахунок інвестицій у проєкт	99
6.3.2 Розрахунок виробничої програми	103
6.3.3 Розрахунок чисельності працівників	103

6.3.4 Розрахунок собівартості виробництва ферменту β -глюканази з продуцента <i>Trichoderma reesei</i>	104
Висновки	112
Перелік джерел посилання	113
Додатки	
Додаток А Постадійна схема технології отримання β - глюканази	126
Додаток Б Специфікація обладнання	127
Додаток В Апаратурна схема технології отримання β - глюканази	129
Додаток Г Монтажний лист	130
Додаток Д Монтажний лист	131

					КРБ.БМтаФХ.1.565-03. І.4									
Вим	Лист	Прізвище	Підпис	Дата	Удосконалення технології отримання β - глюканази				Лім.		Арк.		Акрушіє	
Розроб.		Іванов В.В.												
Керівник		Килименчук О.О							Кафедра БМтаФХ ОНТУ					
Зав.каф.		Капрельянц Л.В												

АНОТАЦІЯ

до кваліфікаційної роботи на тему: «Удосконалення технології отримання β – глюканази»

Робота містить текстову і графічну частини. Текстова частина складається з шести розділів: огляду літератури, техніко-економічного обґрунтування технології, опису типової технології отримання β - глюканази, продуктового розрахунку і матеріального балансу біосинтезу, охорони праці та навколишнього середовища, економічних розрахунків. Графічна частина складається з 4 листів на яких показано: постадійну та апаратурні схеми виробництва, розріз та схема апаратів.

На початку роботи зроблено аналіз наукової літератури щодо виробництва ферментів β - глюканаз, продуцентів цих ферментів та способів їх культивування. Зроблено аналіз поживних середовищ, індукторів та інших умов синтезу даного типу ферментів. Здійснено продуктивний розрахунок та матеріальний баланс на один цикл ферментації, підібрано необхідне обладнання. Описана технологічна схема удосконаленої технології. Описані принципи охорони праці на підприємстві, розраховано економічні показники та проведено аналіз інвестиційної привабливості проекту.

Кваліфікаційна робота містить:

текстової частини – 125 стор.

таблиць – 16

рисунків – 16

додатків – 5

графічних аркушів – 4

ANNOTATION

for the qualifying work on the topic: "Improvement of the technology for obtaining β -glucanase"

The work consists of a textual and graphical part. The textual part is divided into six sections: literature review, techno-economic justification of the technology, description of the typical technology for obtaining β -glucanase, product calculation and material balance of biosynthesis, occupational health and environmental protection, and economic calculations. The graphical part consists of 4 pages showing: a process flow diagram and equipment schemes of production, a section view, and an apparatus diagram.

The work begins with an analysis of scientific literature regarding the production of β -glucanase enzymes, their producers, and cultivation methods. An analysis of nutrient media, inducers, and other conditions for synthesizing this type of enzyme is conducted. Product calculation and material balance are performed for one fermentation cycle, and the necessary equipment is selected. The technological scheme of the improved technology is described. Principles of occupational safety at the enterprise are outlined, economic indicators are calculated, and an analysis of the project's investment attractiveness is conducted.

The qualifying work consists of:

- Textual part: 125 pages
- Tables: 16
- Pictures: 16
- Appendices: 5
- Graphical sheets: 4

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

НТП – норми технологічного проєктування;

ПМ – посівний матеріал;

ПС – поживне середовище;

ТСХ – технологічна схема;

ТУ – технологічне устаткування;

ТЧ – технологічна частина проєкту;

ФП – ферментні препарати;

ФК – ферментні комплекси;

КР – культуральна рідина;

ДР – допоміжні роботи;

ТП – технологічний процес;

ФПВ – фасування, пакування, відпуск;

ЗВ – знешкодження відходів;

ПВ – переробка відходів

МКЦ – мікроцелюлоза

ВСТУП

На сьогоднішній день пиво є одним з найвідоміших алкогольних напоїв у всьому світі і кожен рік відсотки його виробництва зростають та з'являються все нові компанії виробництва пива. Всі заводи, будь то великі компанії чи маленькі крафтові приватні пивоварні, намагаються зробити процес отримання готової продукції більш автоматизованим та зменшити затрати на його виробництво, основною економічною задачею у виробництві пива є зниження його собівартості, чому служить використання високопродуктивного обладнання і скороченого технологічного циклу. В сучасних варильних відділеннях пивзаводів необхідно інтенсифікувати виробничий процес зі зниженням енергоспоживання, максимально ефективно використовувати сировину, знизити кількість вторинних матеріальних ресурсів (дробини) і викидів в атмосферу, забезпечити ефективну роботу обслуговуючого персоналу. І для того, щоб зробити виробництво пива швидшим, простішим, дешевшим та екологічнішим, майже всі виробники використовують ферменти, які забезпечують переваги в процесі обробки сировини. Ферменти дозволяють краще контролювати процес пивоваріння незалежно від типу операції або від того, які інгредієнти застосовуються для його виробництва [1]. Одним з найважливіших ферментів є β -глюканаза, що забезпечує чистоту смаку знижуючи в'язкість затору, підвищує екстрактивність смаку і прискорює фільтрування затору, а також впливає на краще і швидке освітлення пива під час дозрівання. Фермент використовується в пивоварінні, в процесі затирання, для забезпечення ефективності розщеплення β -глюканів, пентозанів і інших слизів. Дві основні причини поганого освітлення пива - це високий вміст β -глюканів в смаку і надмірне завантаження фільтраційного чана. Високий вміст β -глюканів також погіршує фільтрацію пива. Тому зниження завантаження і додавання β -глюканази при затиранні, звичайно, підвищує продуктивність фільтраційних чанів і

фільтрів і дозволяє значно спростити і здешевити процес виробництва пива [2,3].

Метою даної роботи є проєктування ділянки виробництва (апаратурна і технологічна схеми) субстанції β -глюканази грибом у вигляді нев'язкої, прозорої рідини та подальшого її очищення, висушування та фасування.

Актуальність теми - Саме β -глюканаза, ферментний біокаталізатор високого ступеня очищення і ферментативної активності, що каталізує 1,3 і 1,4 гликозидні зв'язку з β -глюканів, розбиває макромолекули в'язкого полімеру до низьков'язких ізомальтози і мальтотріози. Тому β -глюканаза становить інтерес для вирішення проблеми забезпечення чистоти суслу пива, підвищення екстрактивності суслу і прискорення фільтрування затору, а також кращого і швидшого освітлення пива під час дозрівання, що є досить важливим питанням у пивоварінні у багатьох країнах світу, у тому числі й в Україні. Тому вдосконалення технології одержання високоактивної β -глюканази є актуальним завданням, що має значний прикладний характер.

Новизна. Вдосконалення біотехнології одержання ферментного препарату із підвищеною ендоглюканазною активністю шляхом культивування штаму *Trichoderma reesei* на оновленому поживному середовищі, корегуванні параметрів процесу культивування та застосуванні сучасного баромембранного способу його очищення.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Значення геміцелюлазних ферментів у народному господарстві

Бета-глюканаза - фермент отриманий з високоякісного мікроорганізму шляхом глибинної рідкої ферментації і очищення, цей фермент каталізує 1,3 і 1,4 глікозидні зв'язки з β -глюканів, розбиває макромолекули в'язкого полімеру до низьков'язких ізомальтози і мальтотріози.

Бета-глюканаза здатна знизити в'язкість сусла і покращити якість готової продукції.

Сфери застосування:

- Кормовиробництво (збільшення поживної цінності кормів, гідроліз некрохмальних полісахаридів і білків кормів)
- Харчова промисловість (гідроліз некрохмальних полісахаридів, зменшення в'язкості розчинів, збільшення виходу цільового продукту).
- Фермент β -глюканазу застосовують у виробництві етилового спирту;
- У целюлозно-паперовій промисловості ферментом обробляють волокнисті напівфабрикати перед помелом. Це дозволяє знизити витрати енергії на процес. Крім цього, поліпшується зневоднення розмеленої маси і підвищуються показники механічної міцності целюлози.
- Застосовують в пивоварінні для «виправлення» погано відфільтрованого пива, або пива, що має недостатню прозорість, викликану присутністю високомолекулярного -глюкана. Застосування ферментних препаратів в пивоварінні, гідролізуючих некрохмальні полісахариди дозволяє: знизити в'язкість сусла і пива і, тим самим, поліпшити їх фільтрованість; запобігти появі вторинних помутнінь, прискорює фільтрацію пива і сусла [4]

1.2 Класифікація, просторова структура та механізм дії β – глюканаз на глюкан

Бета-глюкани є важливими водорозчинними компонентами, які природно містяться в різних органічних джерелах, таких як зернові культури та мікроорганізми, головним чином гриби [дріжджі], бактерії та водорості[5]. Вони містять розгалужені полісахариди з β -D-глюкози, зв'язаних через (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4) глікозидні зв'язки [6,7] у зернових культурах та бактеріях або через (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) глікозидні зв'язки (рисунки 1a та b) у грибних джерелах [8] відповідно. У зернових культурах глюкозні залишки β -глюканів зв'язані головним чином через два або три послідовні β -(1,4) зв'язки, які розділяє одиничний β -(1,3) зв'язок. Рідше зустрічаються довші відрізки послідовно зв'язаних глюкозних залишків через β -(1,4) зв'язки з ступенем полімеризації від 5 до 28). Немає доказів, що два або більше сусідніх β -(1,3) зв'язки зустрічаються в ланцюгах β -глюканів [9].

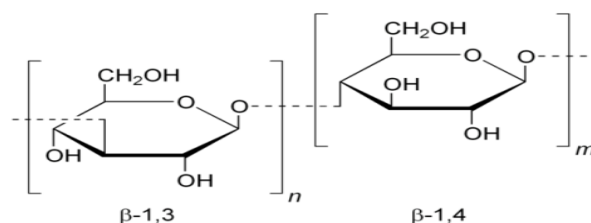


Рис.1.1a Будова зернового β -глюкана

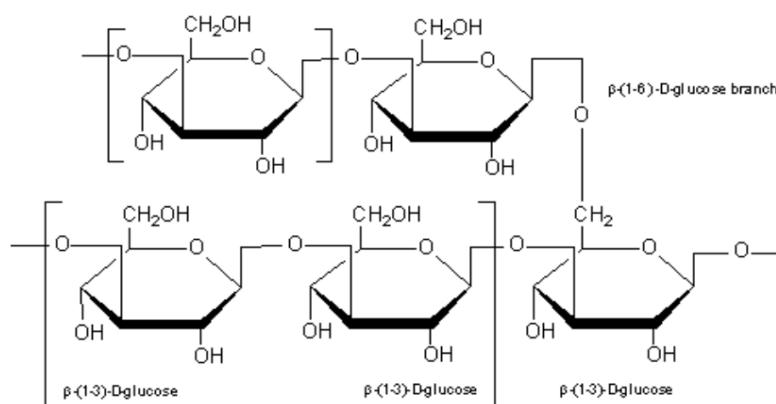


Рис.1.1b Будова грибового β -глюкана

Біосинтез β -глюканів у злакових зернах недостатньо досліджений. Причини, чому синтезуються β -глюкани у злакових, залишаються невідомими. Здатність швидкого накопичення та гідролізу β -глюканів можуть надати більш гнучкий метаболізм, дозволяючи швидко реагувати на фізіологічні сигнали, пов'язані з ініціюванням клітинної стінки при рості, особливо під час проростання. Є кілька досліджень, які намагалися пояснити етапи розвитку зерна, на яких відбувається біосинтез β -глюкану. Ендосперм ячменю накопичує β -глюкани на ранній стадії розвитку [10]. Мікрофібрили целюлози ячменю та кукурудзи покриваються β -глюканами і можуть виступати в якості структурних елементів стінок при вирощуванні клітин на ранніх стадіях розвитку [11,12]. Бета-глюкани є основним компонентом клітинної стінки ендосперму пшениці на ранніх стадіях розвитку зерна [13]. У дозрілій пшениці β -глюкани не є основним компонентом клітинної стінки [10,12,13,14].

1.2.1 Класифікація β – глюканаз

Відповідно до першої класифікації ферментів, розробленої Номенклатурним комітетом Міжнародного біохімічного союзу (IUBMB) у 1961 році, О-глікозидгідролази відносять до класу гідролаз. В основу цієї класифікації був покладений тип каталітичної реакції, і 712 відомих на той момент ферментів були розділені на шість класів. Відповідно до цієї класифікації ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканази (КФ 3.2.1.39) були віднесені до класу гідролаз, що розщеплюють β -(1 $\rightarrow$ 3)-глікозидні зв'язки в (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканах(КФ3.2.1.x). Ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканази класифікуються на три групи, кожній з яких надано власний номер міжнародної класифікації:

1) ендо-(1 $\rightarrow$ 3); (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-глюканази (КФ 3.2.1.6), що каталізують розщеплення не тільки β -(1 $\rightarrow$ 3)- зв'язку, але також β -(1 $\rightarrow$ 4) - зв'язки, прилеглі до тієї сторони β -(1 $\rightarrow$ 3)-зв'язків, яка ближче до відновлювального кінця в (1 $\rightarrow$ 3);(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-глюканах;

2) ліхенази (КФ 3.2.1.73), що каталізують розщеплення β -(1 $\rightarrow$ 4)-зв'язків у (1 $\rightarrow$ 3); (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-глюканах;

3) ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюкозидази (КФ 3.2.1.39), які специфічні до β -(1 $\rightarrow$ 3)- зв'язків глюканів і вимагають наявності щонайменше двох суміжних β -(1 $\rightarrow$ 3)- зв'язків для розщеплення глікозильних зв'язків.

Класифікація глікозидгідролаз CAZy (Carbohydrate Active Enzyme, www.cazy.org) ґрунтується на порівнянні послідовностей амінокислот у молекулах білків. У разі глікозидгідролаз (GH) таке порівняння дозволяє розділити їх більш ніж на 100 сімейств (GH family). Кожне сімейство (GH family) містить білки, подібні за первинною та вторинною структурою. Ця класифікація застосовується лише до ферментів із встановленою первинною структурою. CAZy дозволяє класифікувати білки, для яких відсутні дані про біохімічні властивості, при цьому потрібно пам'ятати, що сама належність ферменту до певного структурного сімейства не дає робити висновки про його каталітичні властивості. Наприклад, у 16 сімейств потрапляють глюканази та карагенази, які каталізують перетворення абсолютно різних у структурному відношенні субстратів – глюканів та карагенанів [15,16].

Згідно з класифікацією CAZy наразі налічується 173 сімейства глікозидгідролаз, розділених на 18 кланів. Клани – це групи сімейств, які мають загальний та каталітичний механізм. Нині вони визначені тільки для глікозидгідролаз. Звичайне позначення – GH-літера (наприклад, GH-A), де буква просто відбиває порядок визначення кланів. 16 сімейство О-глікозидгідролаз входить в клан і містить 27 підродин. Сімейство 16 глікозидгідролаз є одним з найбільш поліспецифічних, оскільки об'єднує ферменти, здатні каталізувати гідроліз цілого спектра вуглеводів, таких як кератансульфати, (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюкани, змішані (1 $\rightarrow$ 3(4))- β -D-глюкани, ксилоглюкани, к-карагенани, агарозу. Воно включає наступні групи ферментів згідно з IUPAC класифікації:

1. Ксилоглюкан-ендотрансфери (КФ 2.4.1.207)
2. Ендо- β -галактозидази (КФ 3.2.1.103)
3. Ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканази (КФ 3.2.1.39)
4. Ендо-(1 $\rightarrow$ 3(4))- β -D-глюканази (КФ 3.2.1.6)
5. Ліхенази (КФ 3.2.1.73)
6. Агарази (КФ 3.2.1.81)
7. κ -Карагінази (КФ 3.2.1.83)
8. Ксілоглюканази (КФ 3.2.1.151)

Ендоглюканази - це глікозил гідролази. Для деполімеризації β -глюкану в рослинах потрібні щонайменше три глюканогідролази з ендо- або екзомеханізмом дії: β -1,4-глюканаза, β -1,3-глюканаза і β -1,4-1,3-глюканаза. Мікроорганізми також виділяють різноманітні ферменти, що розщеплюють β -глюкан і використовують його як джерело енергії. Всі ці ферменти мають різну і сувору специфічність до субстратів, яка залежить від їхньої молекулярної структури. Бета-глюканаза рослин і мікробна β -глюканаза не мають жодної схожості в амінокислотній послідовності та пов'язаній з нею тривимірній структурі, у той час як в результаті конвергентної еволюції вони демонструють однакову субстратну специфічність. Наприклад, рослинна 1,3-1,4-ендо β -глюканаза має 8-барабанну тривимірну структуру, але той самий фермент з бактеріального джерела показав структуру "желейного сендвіча". Бактеріальні β -глюканази мають значні біотехнологічні переваги у пивоварінні та кормовій промисловості. Під час високотемпературної обробки на стадії солодження на пивоварному заводі ендегенні β -глюканази зернових стають термоінактивованими. Отже, нерозщеплені β -глюкани, що залишаються в солоді, викликають серйозні проблеми зниження швидкості фільтрації та виходу. Драглеподібні осаді β -глюканів також впливають на якість пива. Для підвищення швидкості фільтрації важливим є додавання термостабільної β -

глюканази з мікробного джерела, що значно покращує загальну якість пива. Проблеми з травленням у курчат-бройлерів та поросят спричиняє також високий вміст β -глюкану в кормах для тварин. Засвоюваність тваринами зернового раціону покращують ферментні препарати, включаючи мікробну β -глюканазу [17,18]. На основі вирівнювання амінокислотних послідовностей та гідрофобного кластерного аналізу мікробні β -глюканази згруповані в різні родини.

1.2.2. Просторова структура та механізм дії β – глюканаз на глюкан

Ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -глюканази бактерій і тварин належать переважно до 16 сімейства О-глікозидгідролаз, що характеризується просторовою структурою β -глюканази, в якій стійкість білкової глобули підтримується структурою, подібною до гіперболічного параболоїда. Зокрема, дослідження просторової структури (1 $\rightarrow$ 3)- β -глюканази з *Bacillus amyloliquefaciens* методом моделювання з гомології [19] показало, що досліджувана глюканаза має 94% ідентичність з (1 $\rightarrow$ 3);(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-глюканазою з *Bacillus subtilis*, чия просторова структура була отримана методом рентгеноструктурного аналізу. Дана структура виявилася типовим представником сімейства GH16, що має переважання β -листів і формує каталітичну порожнину за типом клешні (рис. 2).



Рис.1.2 Топологія просторової взаємодії ендо-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюканази 16 сімейства з субстратом

Глікозилгідролази (К.Ф.3.2.1.x) - популярна і промислово корисна група ферментів, які беруть участь у гідролізі глікозидних зв'язків всередині молекул

вуглеводів або між молекулами вуглеводів і неуглеводних сполук. Це добре вивчені групи ферментів з широким спектром застосування в харчовій промисловості, деградації біомаси, виробництві біоетанолу, переробці відходів та боротьбі зі шкідниками [20]. GH широко розповсюджені серед прокаріотів, еукаріотів, а також серед архей з численними копіями в кожному організмі. GH класифікують насамперед на основі субстратної специфічності, а також за подібністю послідовностей, каталітичними механізмами та аналізом гідрофобних кластерів.

Першою структурою GH, розгаданою понад 30 років тому, був білок курячого яйця, а саме лізоцим курячого білка. Нині GH об'єднані в 140 родин [21,22], що дає розуміння порівняльних структурних особливостей, еволюційних взаємозв'язків та механізмів дії [23]. Оновлений список родин GH доступний у базі даних Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy). GH мають сегментарну структуру (рис. 3), що складається з каталітичного домену та одного або двох некаталітичних доменів, причому деякі з них, як, наприклад, вуглеводний домен, беруть участь у зв'язуванні субстрату [24].

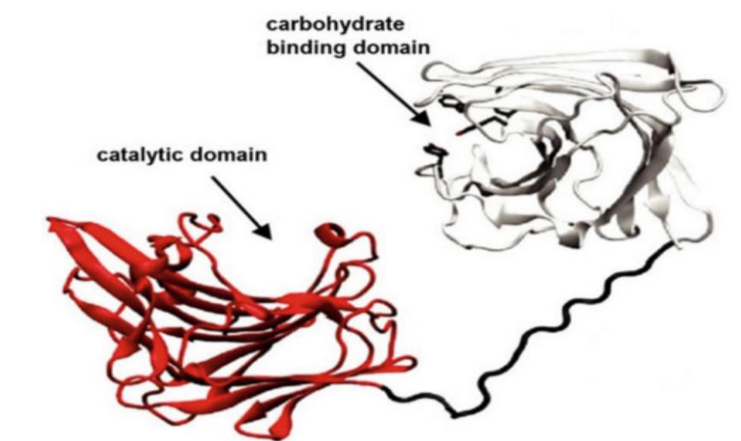


Рис.1.3 Представницька структура білка сімейства GH [25]

Топології активних центрів GH поділяються на три класи - кишенькові або кратерні, щілинні або канавчасті та тунельні.

Кишеня або кратер - розпізнає нередукуючий кінець сахариду, гідролізує переважно аморфні полімери, такі як крохмаль, а також димери, такі

як целобіоза, і вони не дуже ефективні для гідролізу целюлози, наприклад, волокнистих субстратів.

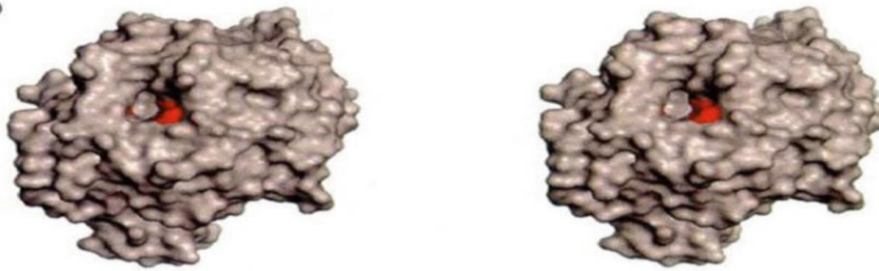


Рис. 1.4 Кишенька або кратер (Глюкоамілаза з *Aspergillus awamori*)

Щілина або канавка - "відкрита" структура хаотично зв'язує цукрові одиниці в полісахаридах, зазвичай зустрічається в ПГ ендогенної дії, таких як ендоцелюлази, лізоцим, хітинази, ксиланази, α -амілази, β -1,3-глюканази та β -1,3-1,4-глюканази.

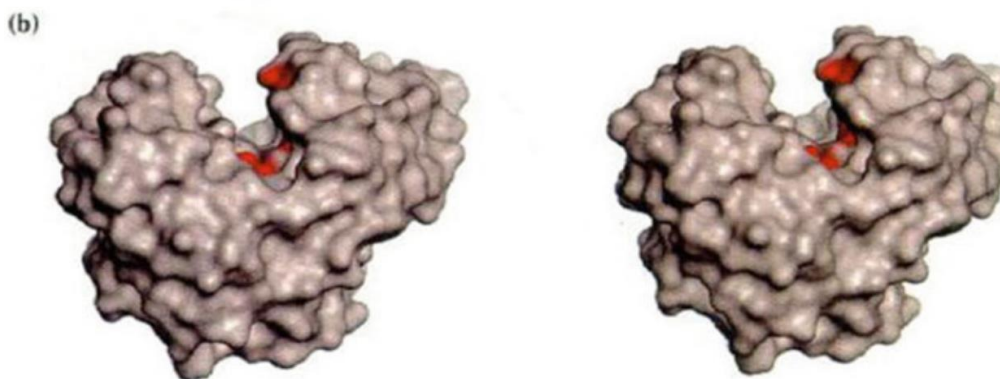


Рис.1.5 Щілина або канавка (Ендоглюканаза E2 з *Thermobifida fusca*)

Тунель - каталітичні кишені знаходяться всередині тунелю і забезпечують прогресивний гідроліз целюлози та екзоглюканазних полімерів. Це дозволяє полісахаридному ланцюгу входити в активну зону з одного входу тунелю "екзо" і вивільняти продукти з іншого боку, міцно затискаючи ланцюг.

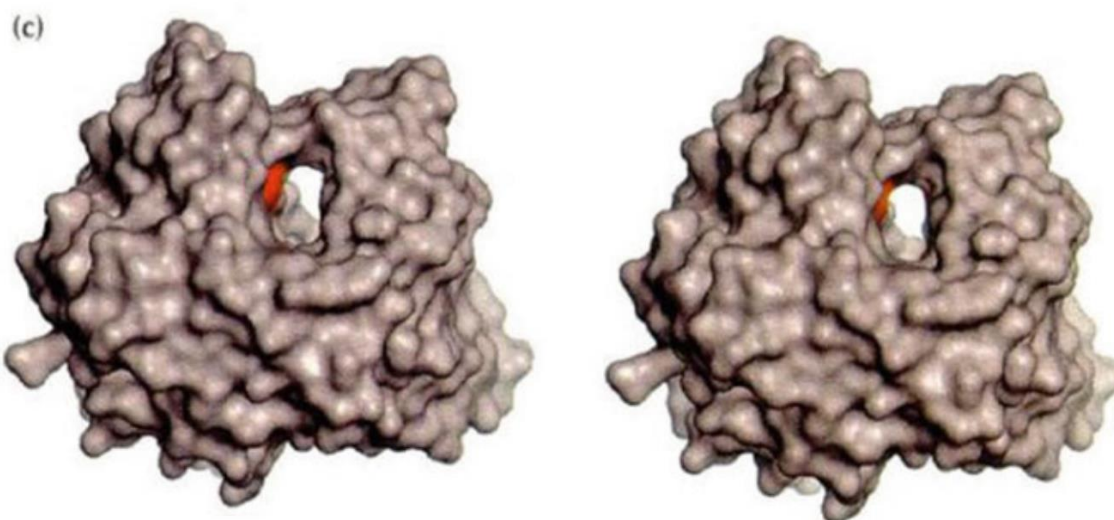


Рис.1.6 Тунель (Целобіогідраза II з *Trichoderma reesei*)

1.3. Фізико-хімічні властивості ендо--(1→3)-β-D-глюканаз

Типові значення оптимального рН для бактеріальних глюканаз складають від 5,5 до 6,0; більшість грибних ендо-(1→3)-β-D-глюканаз мають оптимальне значення рН в слабкокислому діапазоні (3,8-6,0) [26], рідко – в нейтральному або слабколужному діапазоні [27]. Найнижчі значення оптимального (рН 4,0) належать ендо- (1→3)-β-D-глюканазам із бактерії *Delftia tsuruhatensis* [28], мікроводорості *Euglena gracilis* [29] і грибів *Leidodes* [30]. Найвищі значення оптимального рН належать ендо- (1→3)-β-D-глюканазам із бактерій *Bacillus* sp. [31] и *Zobellia galactanivorans* (рН 8,5) [32].

Температурний оптимум складає від 50–60 °С для грибних глюканаз і до 40–50 °С для (1→3)-глюканаз, отриманих із інших джерел [33]. Глюканазы грибів зазвичай стабільні в широкому діапазоні температур 0–70°С [34]. Найнижчі значення температурного оптимума належать глюканазам грибів *Aspergillus fumigatus* (24 °С) та *Alternaria tenuissima* (30 °С) [35], а також тваринних *Tenebrio molitor* (30 °С) [36] і *Mizuhopecten yessoensis* (30 °С) [37]. Найвищі температурні оптимуми належать глюканазам бактерії *Thermotoga maritima* (95 °С) [38] і археям *Pyrococcus furiosus* (105 °С) [39]

1.4 Області застосування ендо-(1→3)-β-D-глюканаз

(1→3)- β -D-глюканази є гідролітичними ферментами, що відіграють незамінну роль в гідролізі вуглеводів для виробництва енергії у грибів і бактерій. Вони також знаходять застосування в промисловості: в пивоварінні, виробництві кормів, в промисловому виробництві дріжджевого екстракту, перетворенні біомаси водоростей в зброджуванні цукри тощо. В той же час, завдяки особливій ролі в формуванні стінок клітин грибів, (1→3)- β -D-глюканази набувають спеціалізованого застосування [40]. А саме, з міцелія *Trichoderma harzianum* була виділена (1→3)- β -D-глюканаза, яку, за твердженням авторів, можна використовувати для боротьби з небезпечним патогеном - грибом *Crinipellis perniciosus*, що пошкоджує какао-дерева. Це обумовлено здатністю цієї глюканази лізувати (1→3)- β -D-глюкани клітинної стінки фітопатогена, пригнічуючи, таким чином, ріст *C. perniciosus* [41]. (1→3)- β -D-глюканазу із *Pseudomonas aeruginosa* МССВ 123 використовували для виділення ДНК із ряду штамів грибів [42]. Проблема якраз у тому, що не існує універсального методу вилучення ДНК з клітин одноклітинних і міцеліальних грибів. (1→3)- β -D-глюканази штамів грибів *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride* і *Trichoderma reesei* виробляються в промислових масштабах [43].

(1→3)- β -D-глюканази не виявляють цитотоксичної дії на клітини тварин, а у високих концентраціях навіть сприяють їх проліферації [42]. Так, згідно висновку Управління з безпеки харчових добавок США (FDA), (1→3)- β -D-глюканаза з аскомицета *Talaromyces emersonii* в 2013 році була визнана безпечною (GRAS).

1.5 Методи отримання β – глюканаз

Фермент β -глюканазу можна отримати кількома способами:

- 1) **Глибинна ферментація:** цей метод використовує мікроорганізми, такі як бактерії або гриби, для виробництва ферменту у рідкому середовищі. Під час ферментації

мікроорганізми виробляють фермент, який потім очищується для використання в промисловості.

Глибинна ферментація є одним із методів отримання ферменту β -глюканази. Цей метод використовується для виробництва ферменту з використанням мікроорганізмів, таких як бактерії або гриби, у рідкому середовищі. У процесі ферментації мікроорганізми виробляють β -глюканазу, яка потім може бути виділена та очищена для використання в промисловості. Існує багато наукових статей, які досліджують процес виробництва ферментів різними методами, зокрема глибинну ферментацію рідкою культурою. Наприклад, у статті [44] дослідники використовували *Aspergillus niger* для виробництва β -глюканази шляхом ферментації у рідкому поживному середовищі. Результати показали ефективність цього методу та можливість використання отриманого ферменту в пивоварінні.

У статті [45] дослідники використовували *Aspergillus niger* для виробництва β -глюканази шляхом поверхневої ферментації культури на основі твердого поживного середовища - пшениці.

2) Поверхнева ферментація : цей метод також використовує мікроорганізми, але замість рідкого середовища вони ростуть на твердих субстратах, таких як зерно. Мікроорганізми виробляють фермент на субстраті, який потім слід очищувати.

Поверхнева ферментація використовує мікроорганізми для виробництва β -глюканази на твердих субстратах, таких як зерно або солома. Цей метод зазвичай використовується для виробництва β -глюканази з використанням грибів, таких як *Trichoderma reesei* та *Aspergillus niger*. Дослідження показали, що використання твердої ферментації для виробництва β -глюканази може бути більш вигідним з точки зору вартості виробництва, порівняно з глибинною ферментацією. Наприклад, дослідження, проведене в Індії, показало, що виробництво β -глюканази на твердих субстратах з

використанням *Aspergillus niger* було ефективнішим за виробництво на рідкому середовищі з тим самим штамом гриба [46]. Однак, на відміну від глибинної ферментації, використання поверхневої ферментації може бути більш складним і часо- та працезатратним процесом. Окрім того, якість поверхневої ферментації може бути менш прогнозованою і залежати від числа факторів, таких як вологість та температура [47].

Таким чином, виробництво β -глюканази методом глибинної ферментації може бути ефективним з точки зору вартості, але вимагає більшої уваги до управління процесом та контролю якості продукту.

Окрім того, відомо, що під час поверхневої ферментації використовують такі види грибів, як *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* та *Phanerochaete chrysosporium*, а також бактерії *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens* [48, 49]. Однією з головних переваг використання поверхневої, твердофазної ферментації є можливість використання дешевих сировинних матеріалів, таких як зерно, солома, кора та інші відходи сільського господарства, які можна використовувати як субстрати для росту мікроорганізмів [49]. Поверхнева ферментація дозволяє виробляти більш концентровані форми ферменту, оскільки мікроорганізми виробляють фермент на поверхні субстрату, а не у рідині. Також культивування поверхневої культури зменшує витрати на енергію, яка витрачається на зберігання та переробку рідинних середовищ [48]. Тобто, підсумовуючи, поверхнева ферментація є ефективним методом виробництва β -глюканази, який дозволяє використовувати дешеві сировинні матеріали та отримувати більш концентровані форми ферменту. Однак, як і в будь-якому іншому методі виробництва, є недоліки, такі як низький вихід продукту та складність контролю якості ферменту [49].

3) Генетична інженерія: цей метод використовує технології генної інженерії для створення мікроорганізмів, які виробляють β -глюканазу. Ген, що відповідає за виробництво ферменту, вводять

в ДНК мікроорганізму, після чого він починає виробляти β -глюканазу.

Отримання ферменту β -глюканазу за допомогою генетичної інженерії базується на використанні рекомбінантних ДНК-технологій для введення гену, що кодує β -глюканазу, в клітини-хазяїни. Один з найпоширеніших методів полягає у використанні експресійних систем, які дозволяють високоекспресивне виробництво рекомбінантної β -глюканазу. Одним з найпоширеніших джерел експресії є бактерії роду *Escherichia coli*, у яких використовують плазмід з геном, що кодує β -глюканазу. Після введення плазмід в клітину, ген β -глюканазу починає експресуватися під контролем промоторів, що забезпечують високий рівень синтезу ферменту. Також, інші організми, такі як дріжджі або рослини, можуть використовуватися для експресії β -глюканазу за допомогою генетичної інженерії. Наприклад, за допомогою введення гену бета-глюканазу в ДНК дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* було досягнуто високоекспресивне виробництво ферменту, що може бути використано для промислового застосування. Дослідження таких методів показали ефективність використання генетичної інженерії для виробництва β -глюканазу. Наприклад, в одному дослідженні було виявлено, що введення гену β -глюканазу в клітини *Escherichia coli* дозволило отримати активну форму ферменту в кількості до 32% загальної білкової маси.

Для отримання β -глюканазу за допомогою генетичної інженерії використовують різноманітні мікроорганізми, такі як бактерії, дріжджі та гриби. Ген, що кодує β -глюканазу, ізолюється з геномів різних організмів і вводиться в плазмід або геном мікроорганізму, який використовується для виробництва ферменту. Після цього проводиться трансформація клітин мікроорганізму з метою включення гену β -глюканазу в їх ДНК.

Є декілька способів трансформації клітин, включаючи електропорацію, генно-пристрійну трансформацію, трансформацію за допомогою вектора та інші. Для забезпечення високого рівня виходу β -глюканазу, інженерні штами

мікроорганізмів можуть бути оптимізовані для збільшення виробництва ферменту. Наприклад, проведені дослідження показали, що інтенсивність виробництва β -глюканази може бути збільшена за допомогою регулювання експресії гена, а також шляхом оптимізації культурних умов, таких як рН, температура, рівень поживних речовин та інші.[50]

Для отримання β -глюканази генетично-інженерні мікроорганізми зазвичай створюють шляхом введення гену, що кодує β -глюканазу, до мікроорганізмів. Наприклад, генетично-модифіковані штами бактерій *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* та *Streptomyces lividans* успішно використовують для виробництва β -глюканази. Одним з методів генетичної інженерії є рекомбінантна ДНК-технологія. За допомогою цієї технології можна отримати поживні середовища, що містять рекомбінантні бактерії, які виробляють β -глюканазу. Такі поживні середовища забезпечують ефективний та швидкий процес виробництва ферменту з високим виходом. [51,52]

Дослідження в галузі генетичної інженерії дозволили змінити фізіологію та метаболізм бактерій з метою отримання високоактивних ферментів, таких як β -глюканазу. Окрім того, генетично-інженерні мікроорганізми дозволяють виробляти фермент в значно більших кількостях, порівняно з традиційними методами, що зменшує витрати на виробництво та робить процес ефективнішим.

Отримання β -глюканази за допомогою генетичної інженерії є одним з найбільш ефективних методів, оскільки цей підхід дозволяє використовувати мікроорганізми для виробництва ферменту в великих масштабах. Крім того, генетично-інженерні мікроорганізми можуть бути оптимізовані для забезпечення високої активності.[53,54]

4) Вилучення з природних джерел: цей метод використовує природні джерела, такі як зерно або плоди грибів, для вилучення β -

глюканази. Фермент вилучають за допомогою різних методів, таких як екстракція або деструкція клітинних стінок.

Бета-глюканаза є розповсюдженим ферментом у природі і може бути отримана з різних джерел, таких як бактерії, гриби, рослини та тварини. Одним з найбільш вивчених джерел β -глюканази є мікроорганізми, зокрема бактерії і гриби.

Для вилучення β -глюканази з природних джерел, таких як бактерії і гриби, застосовуються різні методи. Один з них - це метод екстракції, який включає в себе фізичні та хімічні методи розриву клітинного матеріалу, що містить β -глюканазу, і виділення ферменту з отриманої суміші.

Наприклад, дослідники у своїй статті [56] використовували бактерію *Laetiporus sulphureus var.miniatus*. для виробництва β -глюканази методом екстракції. Вони збирали бактеріальну культуру та виділяли фермент за допомогою ультразвуку та центрифугування. Далі, β -глюканаза була очищена за допомогою хроматографії, і її активність була оцінена за допомогою спектрофотометрії.

Інший метод - це культивування мікроорганізмів у великому масштабі з наступним виділенням β -глюканази. Наприклад, дослідники у статті [55] використовували гриб *Aspergillus niger* для виробництва β -глюканази методом культивування на відходах харчової промисловості.

РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування технології

2.1 Виробництво ферментів в Україні та потреба на ринку β - глюканаз

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

Бета-глюканаза - фермент широкого застосування, який ефективно використовується в технологічних процесах різних галузей: виробництві спирту і пива, целюлозно-паперовій, текстильній промисловості. Фермент каталізує глікозидні зв'язки в'язкого біополімеру β -глюкану, розщеплює його макромолекули до нев'язких ізомальтози і мальтотріози. Бета-глюкани є важливими полісахаридами, що впливають на технологію пивоваріння, оскільки ускладнюють фільтрування суслу та пива і, в результаті, погіршують якість готового продукту. Бета-глюкани відносяться до групи речовин під назвою геміцелюлози, лінійний ланцюг яких сформований із залишків D-глюкози, з'єднаних між собою β -зв'язком за місцем 1 $\rightarrow$ 4 (70 %) або 1 $\rightarrow$ 3 (30 %) вуглецевих атомів. Вони містяться в рослинній сировині, а, особливо, у крохмальному ендоспермі зерна, утворюючи мембрану, що оточує крохмальні гранули, а також в оболонках зерна ячменю або вівса (табл. 2.1) за даними [57, с. 5-7].

Таблиця 2.1 Біохімічний склад зернової сировини

Зернова культура	Крохмаль	Цукри	Клітковина	Гемі-целюлоза	Гумі-речовини	Білки
Пшениця	58-74	2,0-4,0	1,9-2,5	7,3-8,5	0,64	8-24
Жито	50-66	4,0-7,0	1,9-2,8	8,0-12,0	4,0-5,7	11-14
Кукурудза	60-72	1,5-5,0	1,5-1,9	4,6	0,2-0,5	10-12
Ячмінь	54-66	3,0-7,0	4,3-6,0	5,0-7,6	3,3-3,8	9-16
Овес	40-50	-	11,0-17,0	11,0-17,0	5,1-5,5	10-19

Препарати β -глюканази необхідні при переробці зернових культур жита, ячменю, вівса, які містять значну кількість слизу і інших драгледоподібних речовин та характеризуються високим вмістом ксиланів, β -глюканів, інших полісахаридів некрохмального походження. Щоб здійснити нормальний процес затирання при виробництві пива, кількість ферментних препаратів, які вносять, за певний час повинна забезпечити гідроліз біополімерів зернових

культур. Залежність кількості ферментних препаратів, які вносять, від кількості несолодженого ячменю в заторі встановлюють експериментально. Застосування екологічно чистих ферментних препаратів у пивоварінні не знижує відповідно якості кінцевого продукту, підвищує його стійкість і збільшує прибутки. Зазначимо, що ферментні препарати, згідно з технологічними інструкціями та регламентами, застосовують на стадії виробництва сусла.

Основною сировиною для виробництва пива є ячмінний солод. Але при виготовленні деяких найменувань пива передбачено застосування несолодженої сировини - ячмінного або знежиреного кукурудзяного борошна грубого помелу, рисової січки. Кількість несолоджених матеріалів може коливатись залежно від сорту пива.

Для оцукрювання несолодженої сировини до затору додають ферментний препарат з розрахунку 10000 амілазних одиниць на 1 т засипки, яка складається з солоду і несолодженої зернової сировини. Загальна кількість ферментного препарату на затирання G_{ϕ} (кг) розраховується за наступною формулою (1):

$$G_{\phi} = \frac{10000 \cdot G}{OЗ}; \quad (1)$$

де G – маса затертої сировини (солод + несолоджена зернова сировина), т;

$OЗ$ – оцукрювальна здатність 100 г ферментного препарату, амілазних одиниць, (коливається у межах 80-130 амілазних одиниць і зазначається в паспорті препарату) [57, с.12].

Компанія Pro-Consulting здійснила аналіз ринку пива в Україні за 2021 рік [58]. Було зазначено, що пиво є лідером продажів у сегменті алкогольних напоїв із часткою 35 %. Близько 90 % пива в Україні – вітчизняного виробництва, адже імпортне пиво є дорожче, тому на ринку програє в

конкуренції. За якісними показниками українське пиво не поступається закордонним зразкам. Через високу якість даного продукту, його дизайну та різноманітність сортів і способів приготування попит на цей напій постійно зростає. На український ринок пиво постачається в основному великими та середніми підприємствами. Кількість малих пивоварень, згідно проведених досліджень, поступово зменшується, і зараз їх частка становить близько 6 % [58].

За повідомленням ПрАТ «Укрпиво», експертна оцінка обсягу виробництва пива по Україні (крім пива безалкогольного з умістом спирту до 0,5 об. %) за 12 місяців 2022 року становила – 122,8 млн. дал, або 72,1 % до аналогічного періоду 2021 року [59].

Для розрахунку потреби у ферментному препараті нами була використана класична рецептура для приготування пива «Жигулівське», з урахуванням того, що за даними компанії Pro-Consulting виробництво лагер – пива в Україні складає 93,4 % [58]. При виготовленні деяких найменувань пива, як було сказано вище, передбачено застосування несолоджених матеріалів, кількість яких може коливатись залежно від сорту пива від 15 % до 50 %. При виготовленні пива «Жигулівське» застосовують 20 % несолодженого ячмінного борошна. Згідно джерела [57, с. 20] зі 100 кг зернової сировини можна отримати – 524,52 л пива, тобто 52,5 дал. Якщо у 2022 році було отримано 122,8 млн дал. пива, то кількість сировини на його виробництво складатиме – 23524904 кг. На 1 кг загальної зернової маси для виробництва пива потрібно – 0,01 % ферментного препарату, звідки загальна потреба для усіх виробників пива складає – 235249,04 кг ферментного препарату або 235,3 тонни.

Враховуючи, що для виготовлення пива «Жигулівське» використовують солод та несолоджену сировину у співвідношенні 4 : 1, потреба у загальній кількості ферменту зменшується і становить $235,3 : 5 = 47,06$ тонн на рік.

Звичайно, дані про застосування ферментних препаратів при виробництві пива сильно коливаються в залежності від рецептури виробників в ту чи іншу сторону. Виробничі потужності нині діючого Ладижинського заводу ферментних препаратів, за умови стабільної роботи підприємства, дозволяють виробляти 50 т на рік необхідного пивоварам ферментного препарату. Продуцентом високоактивного ферменту β -глюканази може стати грибна культура *Trichoderma reesei* за умови корегування складу поживного середовища та параметрів його культивування, що зможе цілком задовольнити потребу вітчизняних виробників пива у необхідному препараті.

2.2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва

Оскільки з технологічної точки зору і економічної доцільності організувати глибинне вирощування мікроорганізма – продуцента *Trichoderma reesei* значно простіше, ми зупинили свій вибір на технології одержання ФП β -глюканази - глибинним періодичним методом.

Продуктування ферментів β -глюканаз носить індукцйбельний характер. Активне продуктування продуцентом потребує присутності у ПС речовин. Новизною роботи є розробка технології виробництва ферментного препарату β -глюканази з використанням субстратів, які виступають індукторами синтезу – мікроцелюлози (МКЦ) та ячмінного борошна у встановлених нами певних співвідношеннях та веденні технологічного процесу з корегуванням температури, рН у процесі вирощування, застосуванням нового обладнання для концентрування ферменту, що забезпечує максимальне збереження його активності.

Ладижинський завод - виробник «ENZIM» отримує препарат БЕТАЛАД у рідкому стані, що не дозволяє застосовувати тару великого об'єму, скорочує термін зберігання продукції, диктує підвищені вимоги до температури зберігання та освітлення готового рідкого препарату та потребує додаткових спеціальних приміщень для його належного зберігання. Для виділення та

очищення нашого ферментного препарату застосовуємо сепарування, фільтрування на рамних фільтрах та ультрафільтрування на сучасній ультрафільтраційній установці, що дозволить зберегти активність ферменту на цих стадіях, оскільки при осадженні ферменту з КР за допомогою спирту значно втрачається його активність, а при висолюванні виділяються малоактивні фракції ферментів β -глюканаз. Оскільки очищений препарат ми плануємо для використання у пивоварінні, то застосування ультрафільтрації є доцільним. Препарат пропонуємо висушувати на розпилювальній сушарці. Для захисту від втрат активності на цій стадії застосуємо у якості наповнювача допоміжні речовини.

2.3 Обґрунтування вибору біологічного агента

Літературні дані свідчать про те що найчастіше для виробництва використовують грибні культури [60,61,62,63,64,65]

Найбільшу продукуючу здатність серед них мають різні види роду *Trichoderma*: *Trichoderma reesei*, *T. Viride*, *T. Harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. koningii* у *T. virens* [63].

Вибраним мною біологічним агентом є *Trichoderma resseii*, який є продуцентом β -глюканази та який застосовують на Ладизинському ферментному заводі «ENZIM». Штам є стійким до інфікування в умовах виробництва і за умови додавання до ПС індуктору – МКЦ активно продукує комплекс грибних карбогидраз, що включає ендо-1,3- β -глюканазу, - ендо-1,4- β -глюканазу. Ферментний препарат має суттєвий рівень додаткових активностей до розщеплення геміцелюлоз, ксиланів і целюлози.

2.3.1 Характеристика біологічного агента *Trichoderma reesei*

Гриби - це обширна група організмів, число видів яких за Хоуксвордом [66] може сягати 1,5 мільйона, поступаючись лише комахам, а за біомасою, наприклад у ґрунті, вони значно переважають інших членів біоти і можуть складати 90% від загальної маси прокаріотів та безхребетних [67]. За оцінками

деяких таксономістів-мікологів, на даний час описано менше 10% усіх представників царства грибів [68].

Одним з найбільш вивчених грибів на сьогодні є рід *Trichoderma*. Можливо, *Trichoderma* - це єдиний рід, кожен вид якого представлений в ГенБанку, принаймні, одним геном, а багато інших видів представлені послідовністю двох або більшої кількості генів. Причиною інтересу до цього роду є велике практичне та екологічне його значення. Види *Trichoderma* є продуцентами ферментів (целюлази, хітинази, пектинази, ксиланази, серинзалежних протеїназ та ін.), що використовуються в целюлозно-паперовій та харчовій промисловості, виробництві мийних засобів, виготовленні спирту, переробці відходів, що містять целюлозу, в глюкозу [68-70], отриманні кормових добавок [71] та в текстильній промисловості [72]. На основі антибіотиків, токсинів, ферментів грибів цього роду виготовляють препарати для біологічного контролю хвороб і стимуляції росту рослин, а також отримують трансгенні рослини [73,74].

Trichoderma також використовується для біологічної очистки ґрунту та отримання компостів [75]. Відомі також інші властивості *Trichoderma spp.* Наприклад, виявлені види *Trichoderma*, що пошкоджують гриби, які вирощуються промисловим способом, а також ті, що пошкоджують будівельні конструкції. Вони можуть бути причиною алергії та глибоких мікозів у людей зі зниженим імунітетом [76]. Представники роду *Trichoderma* можуть бути знайдені практично в усіх ґрунтах.

Аскоміцети, або сумчасті гриби, відрізняються наявністю добре розгалуженого міцелію з перегородками. У типових представників цих грибів статевий процес призводить до утворення аскогенних гіф, на яких розташовані спеціальні структури, що називаються сумками. Сумка - це клітина, що формується як кінцевий етап статевого процесу після плазмогамії, каріогамії та мейозу. У сумці формуються спори, які відіграють важливу роль у подальшому розмноженні. У деяких аскоміцетів функцію антеридію

виконують спермації - невеликі нерухомі клітини, що потрапляють на аскогін за допомогою повітря, дощу або комах, - або клітини вегетативних гіф - конідії.

У аскоміцетів, безстатеве розмноження може відбуватися за допомогою конідій - спор, що утворюються зовнішньо і мають різну структуру та спосіб формування. Однак, варто зазначити, що для деяких аскоміцетів існують інші способи статевого процесу [77]. *Trichoderma*, як рід грибів, має два типи вегетативного тіла: одноклітинне з перегородками, які формують репродуктивні органи, або багатоклітинне, розгалужене тіло з перфорованими перегородками. Ці гриби кріпляться до субстрата за допомогою спеціальних присосок. Види *Trichoderma* можуть виробляти різноманітні пігменти, що охоплюють широкий спектр кольорів, від яскраво-зеленого до червоно-помаранчевого, хоча деякі з них можуть бути безбарвними. Конідіальна пігментація також варіюється від безбарвної до різних відтінків зеленого, іноді сірого або коричневого. Оскільки морфологічні відмінності в *Trichoderma* є досить обмеженими, ідентифікація видів у цьому роді може бути складною. *Trichoderma* характеризується швидким ростом, переважно яскраво-зеленими конідіями та багато розгалуженою структурою конідієфорів [78]. *Trichoderma* - це широко поширені колонізатори целюлозних матеріалів, тому їх можна часто зустріти в будь-якому місці, де присутній гнилий рослинний матеріал. Вони також поширені у ризосфері рослин, де викликають системну стійкість проти патогенних організмів [79].

Гриби можна знайти на різних місцях, таких як кора, деревина, сухе листя, стебла, а також на насінні різних трав, кущів та дерев. Гриби можна легко виділити з ґрунту за допомогою підкисленого сусла-агару. Після 2-3 днів інкубації при температурі 23-25 °C на поверхні агару з'являється спочатку білий, а потім зеленкуватий рихлий наліт, який складається з міцелію та скупчень конідієносців [79]. Гриби *Trichoderma* характеризуються безбарвними гіфами міцелію з перегородками, які часто мають розгалужену,

гладку структуру. Хламідіоспори цих грибів можуть бути шароподібними або еліпсоїдними. Конідієносці *Trichoderma* є дуже розгалуженими, компактно згрупованими у формі подушечок і можуть бути розташовані хаотично або поодинокі на повітряних гілках. Система розгалуження конідієносців схожа на вітки ялини, де вони відходять від основної осі під великим кутом, утворюючи другорядні розгалуження, і всі вони скорочені до верхньої частини (рис.2.1). Верхівка конідієносця *Trichoderma* має фіоліди - гілки, які нагадують форму кегли або пляшки. На цих фіолідах формуються конідії - грибкові спори, які можуть бути розташовані поодинокі і утворювати шароподібну або більш вузьку головку. Колір конідій може бути безбарвним, жовтим або темно-зеленим (Див. рис. 2.1) [77]. Гриби активно розкладають білкові сполуки і різні вуглеводи від хітину до глюкози, що дозволяє їм отримувати енергію. Крім того, вони володіють антибіотичними властивостями, що робить їх корисними для покращення здоров'я ґрунту та рослин [78].

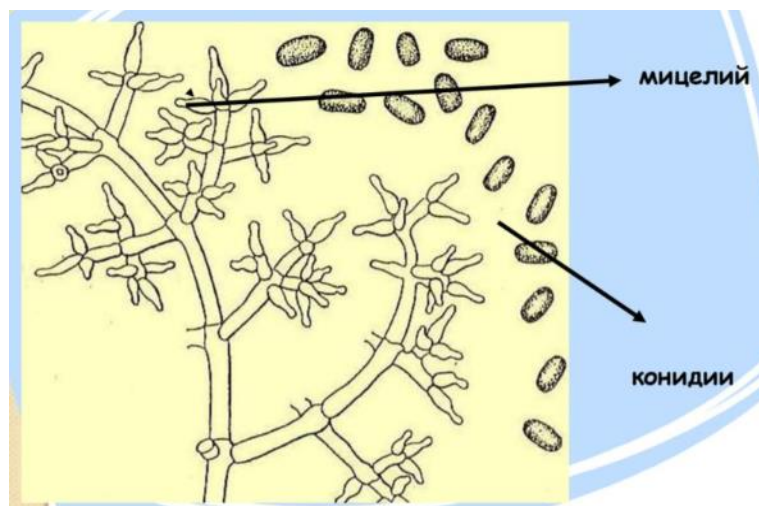


Рис. 2.1 Морфологічна будова; Конідієносці та конідії представників роду *Trichoderma*

Телеоморфна форма *Trichoderma* формує коричневу строму, яка має діаметр 1,5—2,7 мм і містить перитеції. Колонія на солодовому агарі на 4-й день росту розширюється до діаметра 5–7 см і має жовто-зелене забарвлення

- Оптимальні умови культивування: рН = 4,0 – 6,0 та температура 50- 60°C;
- діапазон життєздатності: рН = 3,0-7,0 та температура 30-70°C [63]

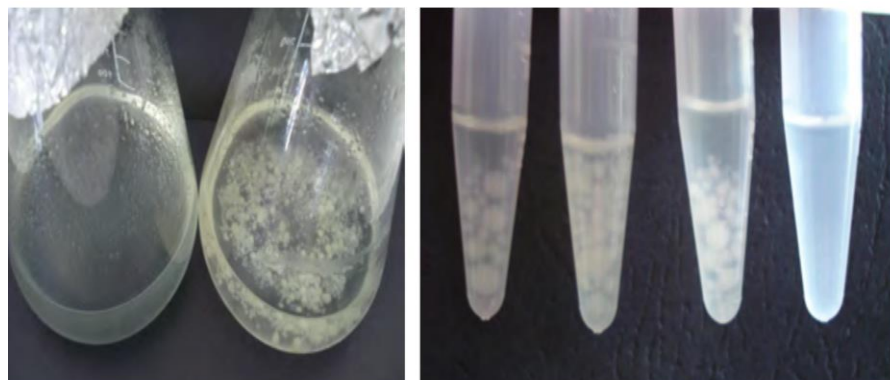


Рис. 2.2 Колонії *Trichoderma reesei* на солодовому агарі

Рід *Trichoderma* проявляє активність у розкладанні целюлози, лігніну, хітину та пектину, завдяки чому його представників часто використовують для отримання ферментів, що здатні розщеплювати ці речовини. Крім того, гриби цього роду проявляють здатність до антагоністичної активності проти численних фітопатогенних грибів. Ця властивість робить їх важливими в контексті їх використання як біофунгіцидів, спрямованих на боротьбу з рослинними захворюваннями. Літична і антагоністична активність грибів *Trichoderma* залежить від наявності кількох генів, які кодують різноманітні позаклітинні гідролази. Серед них ендохітинази, -Нацетилгексоамінідази, протеази, хітин-1,4-хітобіозидази, ендо- та екзо-1,3-глюканази, ліпази, ксиланази, мананази, пектинази, пектинліази, амілази, фосфоліпази, РНКазі, ДНКазі та інші. Гриби роду *Trichoderma* продукують хітинолітичні та глюканолітичні ферменти, які здатні розкладати клітинні стінки фітопатогенних грибів. Ці ферменти спроможні гідролізувати полімери, які не зустрічаються в клітинах рослин. Кожен клас гідролаз включає різні ферменти, що відрізняються за своєю активністю [63].

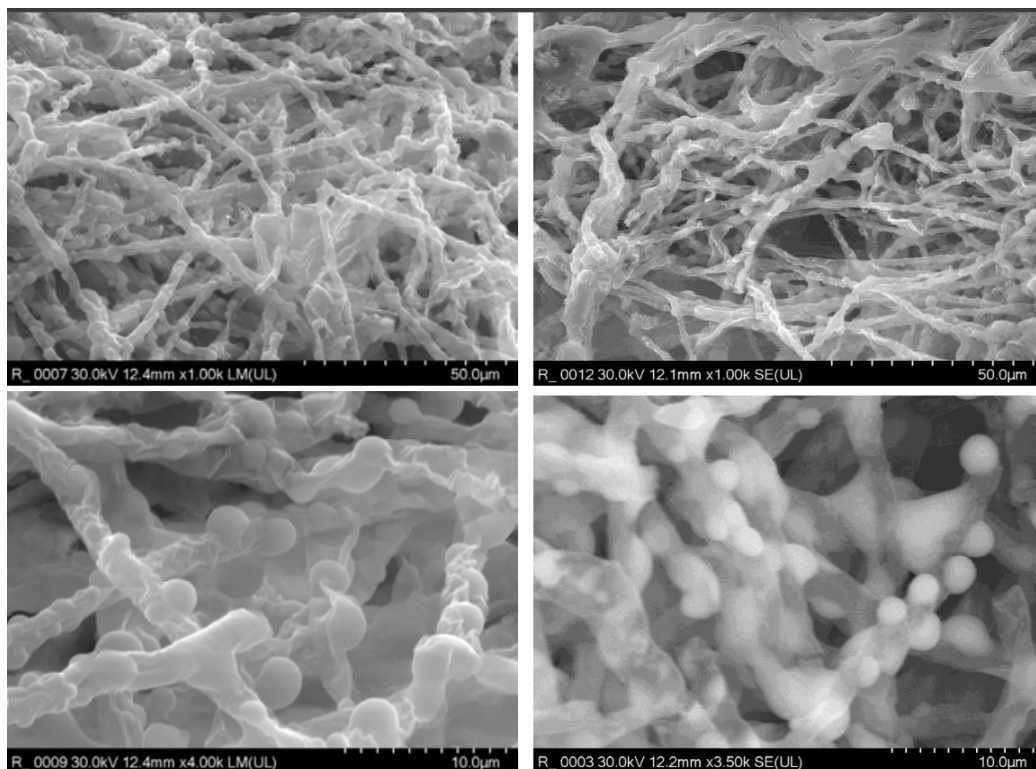


Рис.2.3 Зображення скануючої електронної мікроскопії (SEM), що відкривають морфологічні характеристики *Trichoderma reesei* у культуральному середовищі за умови глибокого культивування. (А) Сильно розгалужені міцелії. (Б) Гіфи, стебла з конідіофорами та головками спорангіїв.

Визначення видової приналежності ізолятів грибів роду *Trichoderma* становить складність, оскільки морфологічні відмінності між ними рідкісні та важко помітні. У 1969 році Ріфай запропонував концепцію "видового агрегату" та класифікував штами *Trichoderma* на основі їх морфологічних особливостей в дев'ять агрегатів. Однак, виявилося, що деякі агрегати містять дві або більше недиференційованих морфологічних форм. У подальших дослідженнях Біссетт (1991) переглянув роботу Ріфая і намагався інтегрувати подібні форми в видову концепцію на основі морфології, зокрема характеристик розгалуження конідієфорів. Як результат, рід *Trichoderma* було розділено на п'ять секцій: *Saturnisporum*, *Pachybasium*, *Longibrachiatum*, *Trichoderma* та *Hypocreanum* [80].

2.3.2 Розмноження мікроміцетів роду *Trichoderma*

Гриби мають три способи розмноження: вегетативний, статевий і безстатевий. Вегетативне розмноження відбувається за допомогою хламідоспор, що представляють собою клітини гіфів з товстою оболонкою. Зазвичай ці спори мають певне забарвлення та містять запасні речовини. Безстатеве розмноження передбачає утворення спеціалізованих органів з диференційованими клітинами, що відповідають за утворення спор. У *Trichoderma* цей процес відбувається за допомогою зовнішнього конідіального спороношення. Конідії формуються на спеціальних структурах, що називаються конідієносцями. На поверхні конідієносця виростають стеригми і фіаліди, які містять конідії. Утворення конідій починається з проростання кінця конідієносця, що призводить до утворення невеликого випирання - пагорба. Потім пагорб відділяється поперечними перегородками, що формуються за рахунок цитоплазматичного випирання. Після дозрівання конідія відпадає і стає початком нової особини [77]. У грибів можуть відбуватися різні типи розмноження, включаючи розмноження ендоспорами, такими як спорангієспори та рухомі амебоїдні клітини. Також присутнє статеве розмноження у аскоміцетів. Цей процес включає запліднення жіночої статевої клітини, відомої як архікарп, чоловічою статевою клітиною-антеридієм. Під час запліднення відбувається злиття цитоплазми, що називається цитогамиєю, і ядер, які зближуються, але не зливаються, утворюючи дикаріон. Після запліднення виростають аскогенні гіфи. У дикаріоні ядра окремо діляться і зливаються, що називається каріогоамією, у сумці, яка розвивається. Після цього відбувається редукційне ділення [77].

Trichoderma reesei (*T. reesei*) - це гриб, що використовується у виробництві різних промислових ферментів, таких як β -глюканаза. Цей гриб був вперше виділений у 1941 році з ґрунту в Північній Каліфорнії, і з того часу він став одним з найбільш вивчених і використовуваних організмів в промисловості.

Оптимальні умови для росту і продуктивності *T. reesei* залежать від багатьох факторів, таких як температура, рН, освітлення та тип культурного середовища. Наприклад, в одному із досліджень було показано, що оптимальна температура для росту *T. reesei* становить 28 °С, при рН 4,5 та вмісті 1% глюкози в культурному середовищі [63]. Крім того, для виробництва ферменту β -глюканази *T. reesei* часто вирощують на культурних середовищах, що містять ліндан, целюлозу, геміцелюлозу, цукри або їх похідні.

Один із способів виробництва ферменту β -глюканази *T. reesei* полягає у використанні метода підвищення продуктивності. Цей метод складається із багаторазового виділення високопродуктивних штамів гриба *T. reesei* з метою покращення їхньої здатності синтезувати β -глюканазу. В результаті описаного процесу були отримані штами *T. reesei* з високою продуктивністю β -глюканази, які можуть бути використані в промислових масштабах [78].

Отже, *T. reesei* є важливим організмом для промислового виробництва β -глюканази, а його культура вимагає оптимізації умов росту та виробництва, включаючи вибір культурального середовища, температури, рН та інших факторів.

РОЗДІЛ 3. Опис технології отримання β - глюканаз

3.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

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

Бета-глюканаза є ферментом широкого застосування і ефективно використовується в технологічних процесах різних галузей: виробництво спирту і пива, целюлозно-паперовій та текстильній промисловості.

Особливості застосування

Дозування залежить від сировини, яка переробляється і технологічного процесу. Температурний діапазон роботи препарату: 30 °С - 70 °С.

Оптимальний діапазон дії рН 4,5 - 5,5.

Ферментна активність: **10000 од/мл**

Упаковка



Рис 3.1 Пластикові каністри: 1, 5, 20 л

Умови зберігання

Зберігати при t° від + 2 °С до + 15 °С в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці протягом 6 місяців.

Фермент отримують шляхом культивування виділеного спрямованою селекцією штамму мікроорганізма природного штамма мікроорганізмів *Trichoderma reesei* без застосування технологій генної інженерії.

Для отримання нашого препарату ферментів в якості продуценту використовуємо продуцент цвілевих грибів роду *Trichoderma*. Використовуємо глибинний метод культивування, як більш економічний з технологічної точки зору. Для виділення ферментів використовуємо центрифугування. Метод ґрунтується на осаджуванні часток, які знаходяться у завислому стані в рідині з використанням відцентрової сили. Фермент очищуємо за допомогою рамних картонних фільтрів та ультрафільтрацією з застосуванням керамічних фільтрів. Отримуємо високо очищений

стабілізований ферментний препарат з індексом Г20х у висушеному стані з прогнозованою β -глюканазою активністю до 5000 од./г.

Вихід біомаси з 1 м³ культуральної рідини становить до 100 кг при вмісті сухих речовин 6–15%. Бета - глюканаза Г20х - розчинний порошок або концентрат світло-жовтого кольору. Термін придатності: 12 місяців, при температурі зберігання від -25°C до + 20°C в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці. Препарат фасують по 0,5–10 кг в поліетиленові або паперові мішки.

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

3.2 Біосинтез ферментів – β - глюканаз та вплив основних факторів і параметрів на цей процес

Мікробний синтез ферментів як і на переважній більшості біотехнологічних виробництв відбувається за стадіями, які тісно пов'язані між собою, але й відрізняються в залежності від мети та принципів її досягнення.

При здійсненні мікробіологічного синтезу, незалежно від методу культивування, необхідними є *стадії приготування поживного середовища і підготовка чистої культури мікроорганізма - продуцента*, який зміг би постійно та в міру необхідності використовуватись у процесі.

Підтримання чистої культури штама – продуцента – ключове завдання будь-якого мікробіологічного виробництва, оскільки високоактивний штам, який не потерпає від небажаних змін, може бути гарантією одержання цільового продукту.

Центральною являється *стадія ферментації*, під час якої відбувається утворення цільового продукту за рахунок перетворення компонентів поживного середовища спочатку в біомасу, а потім, якщо це необхідно, в цільовий метаболіт.

Особливе місце у промисловій біотехнології займає стадія загального виробничого циклу, *виділення і очищення цільового продукту*. Для виробничих мікробіологічних процесів характерно, як правило, утворення дуже розведених водних розчинів або суспензій, які містять окрім цільового продукту велику кількість супутніх речовин, часто дуже близької природи. Тому складність цієї стадії полягає в тому, щоб розділити суміш речовин, як правило, лабільних, які легко піддаються термічній деструкції.

Сучасні технології виділення та очищення ферментних препаратів ґрунтуються на прийомах і методах серед яких найбільш розповсюдженим є діаліз, ультрафільтрація, висаджування солями, гель-фільтрація, електрофорез, афінна хроматографія, іммобілізація та ін.

Переважає більшість мікробних ферментів є водорозчинними білками. Головною умовою виділення ферментів є максимальне збереження нативного стану. Як розчинники ферментів добре себе зарекомендували спирт: етанол і ізопропанол.

Останньою стадією біотехнологічного виробництва є ***виготовлення товарних форм продуктів***. Однією із особливостей цього процесу є те, що препарати для медичних, харчових, лікувально-профілактичних цілей мають бути стерильними, що вимагає спеціальних рішень на стадії розфасовування та укупорювання продуктів. Загальними властивостями більшості продуктів мікробіологічного синтезу є їх недостатня стійкість при зберіганні, оскільки самі вони здатні до розкладання, наприклад, лізису і у такому вигляді можуть бути прекрасним середовищем для розвитку сторонньої мікробіоти, частіше гнилісної.

3.2.1 Поживні середовища для культивування ферментів глюканаз

Джерела вуглецю. Одним з основних елементів, які впливають на ріст і розвиток грибів, є вуглець. Дослідниками було проведено безліч експериментів щодо визначення впливу різних джерел вуглецю на ріст грибів роду *Trichoderma*. [60].

При їх вивченні як продуцентів целюлолітичних ферментів було виявлено, що швидкість росту та розвитку при використанні як джерела вуглецю глюкози, фруктози, сахарози та крохмалю була однаково високою та стабільною. Значне зниження росту спостерігалось під час використання лактози, карбоксиметилцелюлози, целюлози [82].

У питанні вибору джерела вуглецю має місце видо - і штаммоспецифічність [83].

Серед речовин, які засвоюються на порядок гірше за глюкозу, всіма або більшістю вивченими у статті видами грибів *Trichoderma*, автори називають: L- та D- арабіноза, мальтоза, лактоза, етанол, інозитол, D-глюкозоамін, розчинний крохмаль. Аналогічну або кращу засвоюваність у порівнянні з глюкозою, відзначають D- фруктозу, D- маннозу, D- галактозу, D- ксилозу, декстрини.

Джерела азоту. Важливим елементом є азот. Автори стверджують [83], що для зростання *Trichoderma* на буферизованих середовищах з рН 4,2-4,3 як джерело азоту підходять L- аланін, L- аспарагінова кислота, L- глютамінова кислота. Нітрит натрію надавав токсичну дію на культуру, про що свідчила відсутність росту на відповідних середовищах. Відзначено кращий ріст мікроміцетів на середовищах, що містять іони амонію, ніж на середовищах, що містять нітрати. Вважається [83], що як неорганічний джерело азоту краще застосовувати нітрат амонію (аміачну селітру).

Згідно з даними інших авторів [84], при порівнянні джерела азоту нітрату калію, нітрату натрію і сульфату амонію, найбільший вихід біомаси

був отриманий при використанні сульфату амонію (25,6 г/л), а найменший - при використанні нітрату натрію (22,2 г/л).

Фізико-хімічні фактори середовища. Одним із важливих факторів, що визначають нормальне зростання триходерми та її біосинтетичні можливості, є реакція середовища. При її зміні в область несприятливих значень організм перестає рости навіть у тих випадках, якщо решта умов є оптимальними. Під час дослідження оптимальної кислотності середовища було встановлено [85], що, залежно від виду, максимальний ріст грибів спостерігається при рН у межах від 3,7 до 4,7. Зміна рН середовища впливає на накопичення кінцевих продуктів обміну речовин триходерми в культуральній рідині.

Важливим чинником, що впливає на зростання культури, є температура культивування. Відповідно до [85] для різних видів *Trichoderma* оптимальна температура росту відрізняється і лежить в межах від 22 до 34 °С.

Гриби роду *Trichoderma* є аеробами, тому для них особливо важливий режим аерації. Так, при культивуванні в колбах Ерленмейєра необхідно, щоб об'єм поживного середовища не перевищував 20% об'єму колби. Оптимальна швидкість перемішування становить 150 об/хв [86].

Спороутворення. Для отримання культуральної рідини, яку можна було б використовувати як біопрепарат-пестицид, після максимального накопичення біомаси грибом необхідно індукувати процес утворення конідій та/або хламідоспор, поєднаний з автолізом міцелію, і домагатися максимального конідієутворення [87].

Є кілька факторів, що сприяють індукції процесу спороутворення у грибів роду *Trichoderma*:

- Мінеральні елементи живлення. Виявлено, що іони Ca^{2+} сприяють активації процесу спороутворення у *Trichoderma viride* [88]
- Наявність підходящого середовища: Гриби *Trichoderma* сприймають певні умови навколишнього середовища, які спонукають їх до

спороутворення. Це може включати наявність відповідних харчових речовин, оптимальну температуру та вологість.

- Фізичні фактори: Деякі фізичні фактори, такі як світло, температура та вологість, можуть впливати на індукцію спороутворення у грибів *Trichoderma*. Наприклад, певні види можуть спороутворювати під впливом світла або високих температур.
- Взаємодія з іншими мікроорганізмами: Взаємодія з іншими мікроорганізмами, такими як бактерії або гриби, може сприяти спороутворенню у грибів *Trichoderma*. Це може бути наслідком конкуренції за ресурси або взаємодії на генетичному рівні [88].

3.2.2 Отримання препаратів з глибинних аеробних культур

Умови культивування. За всіма основними факторами для кожного продуцента вивчаються його фізіологічні і біосинтетичні особливості і конструюється оптимальне поживне середовище, бажано з використанням математичних методів планування експериментів з урахуванням міжфакторної взаємодії. Не менш важливий вибір оптимальних умов культивування продуцента, а саме: вид і дозування посівного матеріалу, рН середовища, температура і тривалість культивування, ступінь аерування і перемішування культури і деякі інші показники.

В якості посівного матеріалу можна використовувати поверхневу культуру продуцентів, споровий матеріал або молоду глибинну культуру. В нашій країні в якості посівного матеріалу найчастіше використовують заспоровану поверхневу культуру або ту саму культуру, але активовану шляхом підрощування спор глибинним способом. Сутність такої обробки полягає в наступному. Поверхнева посівна культура вирощується протягом 7-9 діб до рясного спороношення на твердому поживному середовищі. Така культура містить від $4,0 \times 10^8$ до 7×10^8 спор на 1 г культури. Готова посівна культура протягом 12 годин активується в сольовому розчині, що містить іони кобальту і марганцю, і використовується в кількості 0,2-0,3% для засівання

виробничого середовища. Активований таким чином посівний матеріал дозволяє на 10-20% скоротити час вирощування культури і на 20-30% підвищити біосинтетичну активність продуцента. Дуже велике значення має початкове рН середовища і набір солей, які входять до складу середовища, тобто всі умови, які визначають зміни активної кислотності середовища в процесі росту культури.

Температура вирощування помітно впливає на синтез β -глюканазних ферментів. Основна маса продуцентів належать до мезофільних мікроорганізмів, оптимум зростання для яких знаходяться при температурі 28-30°C. Змінюючи температурний режим, можна інтенсифікувати біосинтез тих чи інших ферментів. На стадії росту культури (в перші 20-24 години) можна підвищити температуру на 2-4°C. В цих умовах активуються всі ферментні системи, кілька прискорюється зростання і накопичується більше біомаси. Далі температуру необхідно знизити до оптимальної (30°C) з тим, щоб не викликати передчасний автоліз культури, і потім для продовження біосинтетичних процесів температура знижується ще на 2-3°C. Такий диференційований режим багаторазово на самих різних культурах давав позитивний ефект [85].

3.2.3 Виділення ферментів

Для виробництва очищених ферментних препаратів спочатку від культури відокремлюють всю нерозчинну частину, а фільтрат або відразу ж після охолодження надходить на осадження органічними розчинниками, або попередньо концентрується методом ультрафільтрації або вакуум-випарюванням, коригується рН ферментного розчину, і проводиться розчинниками або нейтральними солями. Концентрування ферментних розчинів методом ультрафільтрації проходить зазвичай успішно. Втрата активності не перевищує 6-8%. Найбільша швидкість процесу за ступенем концентрування 10 встановлена при надмірному тиску 0,4 МПа.

При сушінні ультраконцентратів, що містять ферменти, методом розпилення відзначається, що вони чутливі до температури, і тому спостерігається істотна втрата активності. Для зниження втрат рекомендується перед сушінням розпилюванням з наповнювачем стабілізувати розчин сірчаноокислим алюмінієм, що дозволяє при режимі сушки з температурою повітря 140-160°C на вході і 70-80°C на виході отримувати препарати з втратою активності, не перевищує 5-10%.

Процес осадження ферментів з культуральної рідини і її концентратів залежить від рН середовища і природи і концентрації розчинника. Для виробництва препаратів з індексом Г10х зазвичай використовується етиловий спирт. Про вплив вище наведених факторів може свідчити приклад виділення ферментів з культуральної рідини *A.foetidus* 7 (табл. 3.1,3.2)

Таблиця 3.1 Виділення ферментів з культуральної рідини

Показник	рН культуральної рідини				
	3,2	3,5	4,0	4,5	5,0
ПкА					
од./мл	0,177	0,151	0,160	0,150	0,153
од./г осаду*	-	16,63	12,06	11,13	10,82
Маса осаду, %	-	0,37	0,53	0,54	0,57
Залишкова активність ферментів, % від вихідної в осаді	100	85,31	90,40	84,75	86,44

*осадження етанолом в співвідношенні 1:3,5.

Таблиця 3.2 Виділення ферментів з культуральної рідини

Показник	Відношення об'єму культуральної рідини і до об'єму етилового спирту (при рН 4,0)
----------	--

	1:0	1:2,5	1:3	1:3,5	1:4
Концентрація етилового спирту в суміші, %	0	71,4	75	77,7	80
ПкА	0,186		0,163	0,161	0,162
од./мл		0,16916,37			
од./г осаду*	-		15,83	11,40	11,25
Залишкова активність ферментів, % від вихідної в осаді	100	98,86	87,63	86,56	87,10

Сухі ферментні препарати ферментів зі спиртоосаджених осадів раціонально отримують шляхом подальшої сушки сублімацією або розпиленням. Однак при сушінні розпиленням спостерігається значна інактивація ферментів (на 20-40%), що неприпустимо. Відзначається, що вони менше стабільні після осадження спиртом, ніж після концентрування ультрафільтрацією. Для запобігання інактивації осаду перед сушінням концентрат ферментів розчиняють в мінімальній кількості води (1:5), додають наповнювач (зазвичай хлористий натрій) і стабілізатор (ефективніше інших проявляє себе сірчаноокислий алюміній). Потім такий розчин висушують методом розпилення. При температурному режимі сушильного агента 140°C на вході і 70°C на виході втрати ферментів не перевищує 4-6% [64].

Ферментні препарати можна отримувати і шляхом висолювання сульфатом амонію. Однак такі препарати містять 50-70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Якщо за умовами застосування препарат не повинен містити сульфат амонію, то висолений препарат розчиняють, діалізують проти води або буферного розчину, ліофільно висушують [64].

3.2.4 Отримання товарних форм

Сушку розпиленням проводять при м'якому режимі (температура теплоносія на вході 120-125°C і на виході 55-60°C). При осадженні органічними розчинниками рН оброблюваного розчину 6,5-6,8 при осадженні 2-2,5 об'ємами ацетону активність ферментів в осадах зберігається на 93-95% від вихідної.

Розробка методів виділення ферментних препаратів з культуральної рідини показали, що глюканази, синтезовані різними мікроорганізмами, досить лабільні в процесі концентрування і вимагають присутності стабілізаторів. Найчастіше стабілізаторами виступають солі кальцію, магнію, кобальту та інших двохвалентних металів.

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

Безпека виробництва та застосування асептичних умов виробництва є невід'ємними вимогами до будь-якого біотехнологічного 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.

Пакування

- 1) Пакування ферментних препаратів має проводитися в тару, зазначену в табл.3.3.

Таблиця 3.3. Пакування ферментних препаратів

Види і форма препарату	Тара для пакування		Маса нетто в споживчій тарі, кг
	Споживачам	транспортна	
1	2	3	4
1. Технічні:			
а) суха культура гриба (індекс Г10х, Г20х)	-	Мішки паперові непросочені, відкриті по ГОСТ 2226 склеєні або зшиті будь-якої марки	10-15
б) одержувані при розпилювальній сушці (Індекс Г13х)	Мішки з поліетиленової плівки за ГОСТ 10354 або мішки поліетиленові по ГОСТ 17811 або мішки-вкладиші плівкові для хімічних реактивів і продукції по ОСТ 6 19-56	Мішки паперові відкриті зшиті або склеєні по ГОСТ 2226 марки НМ	5-10 10-15
2. Очищені і іммобілізовані порошкоподібні і гранульовані, отримані різними методами очищення (індекси Г10х,	Мішки з поліетиленової плівки за ГОСТ 10354 або мішки поліетиленові по ГОСТ 17811 або мішки-вкладиші плівкові для хімічних реактивів і продукції по ОСТ 6 19-56	Мішки паперові відкриті по ГОСТ 2226 зшиті або склеєні марки НМ; ящики дощаті для продукції харчової промисловості по ГОСТ 10131 типу V-1; ящики з гофрованого картону по ГОСТ 13511, ГОСТ 13514, ГОСТ 13841;	10-15

Г20х і інші позначення)		ящики дерев'яні посилені за документацією	
3. Високо-очищені	Флакони з нейтрального скла місткістю від 1 см ГОСТ 26142-84 Препарати ферментні. Упаковка, маркування, транспортування і зберігання (зі Зміною N 1) до 30 см ГОСТ 26142-84 Препарати ферментні. Упаковка, маркування, транспортування і зберігання (зі Зміною N 1) по НТД з гумовими пробками і алюмінієвими ковпачками або гумовими пробками, що забезпечують герметичність	Ящики з гофрованого картону для медикаментів по ГОСТ 64-064	0,5-15
4. Рідкі	-	Каністри місткістю до 20 дм ³ ГОСТ 26142-84 Препарати ферментні. Упаковка, маркування, транспортування і зберігання (зі Зміною N 1) за діючою документації; фляги металеві по ГОСТ	0,1-10,0г

		5037 місткістю 25 дм ³ ГОСТ 26142-84	
5.Вторинні продукти виробництва ферментних препаратів (сухі)		Мішки паперові непросочені, відкриті по ГОСТ 2226, склеєні або зшиті будь-якої марки, окрім НМ	10-15

Примітка. Маса нетто препарату в споживчій тарі, що поставляється підприємствам комбікормової промисловості, повинна бути 15 кг.

2) Шви поліетиленових мішків повинні бути звареними, включаючи шов завантажувального отвору. Термозварювання має забезпечувати герметичність упаковки.

3) Ящики з гофрованого картону повинні бути обклеєні клейовою стрічкою на паперовій основі за ГОСТ 18251.

4) Допускається використання ящиків дерев'яних або ящиків з гофрованого картону, що були у вжитку. Ящики повинні бути міцними, чистими, сухими і без сторонніх запахів.

5) Маса нетто ферментного препарату в транспортній тарі повинна бути 10-15 кг, при механізованому навантаженні і вивантаженні - 20-25 кг. Відхилення від маси повинні бути не більше $\pm 1,5\%$.

6) При укладанні в ящик продукції, упакованої в дрібну скляну тару,кладають жорсткі вкладиші-решітки і горизонтальні прокладки з картону, що був у використанні.

Маркування

1) Маркування споживчої тари

1.1) Маркування повинна бути нанесена на кожну одиницю споживчої тари або на ярлик і містити такі дані:

- найменування підприємства-виробника та його товарний знак;
- найменування препарату;
- номер партії;
- масу нетто;
- масову частку вологи;
- дату виготовлення;
- найменування наповнювача;
- ферментативну активність;
- гарантійний термін зберігання;
- позначення нормативно-технічного документа на продукцію.

Примітка. У разі, коли препарат фасують в поліетиленові мішки по 10-15 кг з подальшою упаковкою в паперові мішки, маркування наносять тільки на паперовий мішок.

1.2) Маркування наносять фарбою за допомогою трафарету, штемпелюванням, маркувальними машинами. Допускається наносити маркування на ярлик друкарським способом.

2) Транспортне маркування

2.1) Транспортне маркування - за ГОСТ 14192 з нанесенням маніпуляційних знаків "Берегти від вологи", "Крихке. Обережно" (для продукції в скляних флаконах) і маркування, що характеризує продукцію:

- найменування підприємства-виробника та його товарний знак;

- найменування препарату;
- номер партії;
- масу нетто;
- дату виготовлення;
- кількість одиниць споживчої тари (при необхідності);
- ферментативну активність;
- найменування наповнювача;
- гарантійний термін зберігання;
- позначення нормативно-технічного документа на продукцію.

2.2) Маркування, що характеризує продукцію, повинна бути нанесена на мішки - під транспортним маркуванням, нанесеної по ГОСТ 14192, на ящики - на бічну поверхню, не зтягнуту транспортним маркуванням. Спосіб нанесення маркування, що характеризує продукцію, повинен відповідати вимогам ГОСТ 14192.

2.3) На посилові ящики повинна бути нанесені такі позначки:

на верхню кришку - адреса і найменування одержувача та відправника;

на бічну поверхню - найменування ферментного препарату і його масу.

Транспортування

3) Ферментні препарати транспортують залізничним і автомобільним транспортом в критих транспортних засобах, а рідкі препарати також і наливом в автоцистернах згідно з ГОСТ 9218 і спеціалізованих залізничних цистернах по ГОСТ 10674 відповідно до правил перевезень вантажів, що діють на даному виді транспорту.

3.1) Допускається транспортування ферментних препаратів, упакованих в транспортну тару, в універсальних контейнерах за ГОСТ 15102, ГОСТ 20435 або згідно з ГОСТ 22225.

Допускається транспортування продукції транспортними пакетами по ГОСТ 24597, ГОСТ 21650 і іншої нормативно-технічної документації.

Для пакетування застосовуються плоскі піддони по ГОСТ 9078 або ГОСТ 9557. Формування пакетів на плоских піддонах - по ГОСТ 26663.

3.2) Не допускається транспортування ферментних препаратів спільно з мінеральними добривами, отрутохімікатами, кислотно-лужними речовинами, а також з хімічними відбілювачами для синтетичних миючих засобів.

Не допускається також спільне транспортування ферментних препаратів, призначених для потреб побутової хімії, і ферментних препаратів для харчової промисловості.

Зберігання

4) Ферментні препарати повинні зберігатися в закритій тарі, в приміщеннях, що виключають потрапляння прямих сонячних променів, на дерев'яних стелажах або піддонах, окремо по партіях, при температурі не вище плюс 25°C і не нижче мінус 25°C.

4.1) Не допускається зберігання ферментних препаратів з речовинами, зазначеними в п.3.2.

РОЗДІЛ 4. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК І МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС БІОСИНТЕЗУ

4.1 Продуктовий розрахунок виробництва ФП β - глюканази Г20Х потужністю 50 умов. тонн на рік

Початкові дані для розрахунку:

Культура біологічного агенту – *Trichoderma reesei*

Таблиця 4.1 - Продуктовий розрахунок виробництва ФП β - глюканази Г20Х

Г _{УТ} – потужність підприємства в умовних тонах на рік ;	Г _{УТ} = 50
Т _{РД} – кількість робочих днів у рік;	Т _{РД} = 308
А _{СТ} – стандартна активність препарату, од./г;	А _{СТ} = 3500
А _{УО} – умовна активність препарату, од./г;	А _{УО} = 5000
А _{КР} – активність культуральної рідини, од./мл	А _{КР} = 12
Т _{ЦФ} – час циклу роботи ферментера, год.	Т _{ЦФ} = 144
Т _{ЦП} – час циклу роботи посівного апарату, год.	Т _{ЦП} = 50
Т _{ЦІ} – час циклу роботи інокулятора, год.	Т _{ЦІ} = 50
К ₁ – коефіцієнт запасу, 1,1–1,5;	К ₁ = 1,1
К _З – коефіцієнт заповнення ферментера, частка: барботажного – 0,45–0,55 <u>комбінованого</u> – 0,5–0,7	К _З = 0,7
К _{ПА} – коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка	К _{ПА} = 0,6
К _{ІН} – коефіцієнт заповнення інокулятора, частка	К _{ІН} = 0,55
К _{ЗБ} – коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7–0,8)	К _{ЗБ} = 0,8
Е _{СВ} – сумарні втрати активності при виділенні готового продукту, частка	Е _{СВ} = 0,275
Х _{ВФ} – засівна концентрація ферментерів, частка (0,05–0,1)	Х _{ВФ} = 0,1
Х _{ПА} – засівна концентрація посівних апаратів,	Х _{ПА} = 0,1

частка (0,02–0,1)

$X_{\text{ІН}}$ – засівна концентрація інокуляторів, частка (0,02–0,1)	$X_{\text{ІН}} = 0,1$
$X_{\text{КОЛ}}$ – засівна концентрація в колбах, частка (0,02–0,1)	$X_{\text{КОЛ}} = 0,02$
$E_{\text{Ф}}$ – втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1–0,2)	$E_{\text{Ф}} = 0,2$
$E_{\text{ПА}}$ – втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка (0,1–0,2)	$E_{\text{ПА}} = 0,1$
$E_{\text{ІН}}$ – втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка (0,1–0,2)	$E_{\text{ІН}} = 0,1$
$E_{\text{КОЛ}}$ – втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка (0,01–0,02)	$E_{\text{КОЛ}} = 0,02$

Відсоток сухих речовин в посівному матеріалі для засівання виробничих ферментерів, % $СР_{\text{ПА}} = 2,7$

Відсоток сухих речовин в посівному матеріалі для засівання посівних апаратів, % $СР_{\text{ІН}} = 5,4$

Відсоток сухих речовин в посівному матеріалі для засівання інокуляторів, % $СР_{\text{КОЛ}} = 2,7$

Відсоток сухих речовин в готовій культуральній рідині, % $СР_{\text{КР}} = 5,40$

Склад поживного середовища

	%	частка
Соєве борошно Soya Flour "Albatros on Carp"	$C_1 = 1,62$	0,0162
калій фосфорнокислий KH_2PO_4	$C_2 = 0,58$	0,0058
сірчаноокислий амоній $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$C_3 = 0,92$	0,0092
Кальцій хлористий CaCl_2 (ХІМСЕЙЛ)	$C_4 = 1,0$	0,01
Магній сірчаноокислий $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$C_5 = 1,0$	0,01
МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	$C_6 = 1,07$	0,01076
Лактоза	$C_7 = 1,62$	0,0162
Твін 80- полісорбат	$C_8 = 0,1$	0,001
	$C_{\Sigma} = 7,91$	0,07916

1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

1.1. Кількість натуральних тонн продукту в рік

$$G_{HT} = G_{UM} \cdot A_{УО} / A_{СТ}$$

$$G_{HT} = 71$$

1.2. Кількість продукту на добу, нат. т/добу

$$G_{HTD} = G_{HT} / T_{РД}$$

$$G_{HTD} = 0.231$$

1.3. Кількість одиниць активності на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{СВ}$), од.

$$A_{СТД} = G_{HTD} \cdot A_{СТ} \cdot 10^6 / (1 - E_{СВ})$$

$$A_{СТД} = 111517241$$

1.4. Об'єм культуральної рідини на добу, м³/добу

$$V_{КРД} = A_{СТД} \cdot 10^{-6} / A_{КР}$$

$$V_{КРД} = 9.29$$

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

$$V_{КР} = V_{КРД} \cdot T_{ЦФ} / 24$$

$$V_{КР} = 55.75$$

1.6. Кількість ферментацій (циклів) на рік

$$N_{ЦК} = 24 \cdot T_{РД} / T_{ЦФ}$$

$$N_{ЦК} = 51.3$$

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

$$G_{ЦК} = G_{HT} \cdot 10^3 / N_{ЦК}$$

$$G_{ЦК} = 1384$$

1.8. Вихід фермента у нат. кг з 1 м³

$$q_{НАТ} = G_{ЦК} / V_{КР}$$

$$q_{НАТ} = 24.8$$

1.9. Вихід фермента в умов. кг з 1 м³

$$q_{УМ} = q_{НАТ} \cdot A_{СТ} / A_{УО}$$

$$q_{УМ} = 17,36$$

2. Розрахунок складу поживного середовища для виробничих ферментерів, посівних апаратів, інокуляторів та качалочних колб

2.1. У відповідності з прийнятим складом поживного

середовища його витрати на $V_{КР}$ культуральної рідини складають, т:

$$V_{КР} = 55.75$$

$$G_0 = V_{КР} \cdot C_{\Sigma}$$

$$G_0 = 4.4$$

в тому числі, кг		$G_0 =$	4413
Соєве борошноSoya Flour "Albatros on Carp"	$g_1 = G_0(C_1/C_\Sigma)$	$g_1 =$	903
калій фосфорнокислий KH_2PO_4	$g_2 = G_0(C_2/C_\Sigma)$	$g_2 =$	323
сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$	$g_3 = G_0(C_3/C_\Sigma)$	$g_3 =$	513
сірчаноокислий магній $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$	$g_4 = G_0(C_4/C_\Sigma)$	$g_4 =$	558
Кальцій хлористий $CaCl_2$	$g_5 = G_0(C_5/C_\Sigma)$	$g_5 =$	558
МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	$g_6 = G_0(C_6/C_\Sigma)$	$g_6 =$	597
Лактоза	$g_7 = G_0(C_7/C_\Sigma)$	$g_7 =$	904
Твін 80- полісорбат	$g_8 = G_0(C_8/C_\Sigma)$	$g_8 =$	56
Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг		$G_0 =$	4412

2.2. Розрахунок вихідної сировини на приготування

поживного середовища для виробничої ферментації

з урахуванням втрат ($E_\Phi, \%$)

$$G = G_0 / (1 - E_\Phi), \text{ кг} \quad G = \mathbf{4902}$$

в тому числі:

Соєве борошноSoya Flour "Albatros on Carp"	$G_{01} = G(C_1/C_\Sigma)$	$G_{01} =$	1004
калій фосфорнокислий KH_2PO_4	$G_{02} = G(C_2/C_\Sigma)$	$G_{02} =$	359
сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$	$G_{03} = G(C_3/C_\Sigma)$	$G_{03} =$	570
сірчаноокислий магній $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$	$G_{04} = G(C_4/C_\Sigma)$	$G_{04} =$	620
Кальцій хлористий $CaCl_2$	$G_{05} = G(C_5/C_\Sigma)$	$G_{05} =$	620
МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	$G_{06} = G(C_6/C_\Sigma)$	$G_{06} =$	663
Лактоза	$G_{07} = G(C_7/C_\Sigma)$	$G_{07} =$	1004
Твін 80- полісорбат	$G_{08} = G(C_8/C_\Sigma)$	$G_{08} =$	62
Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг		$G_\Sigma =$	4902

2.3. Маса сухих речовин у посівному матеріалі, який

необхідний для засівання виробничих ферментер

($CP_{ПА}, \%$), кг

$$G_2 = G \cdot CP_{ПА}$$

$$G_2 = 132$$

2.4. Витрати сухих речовин поживного середовища

($CP_{ПМ}$) на приготування посівного матеріалу в

посівних апаратах з врахуванням втрат ($E_{ПА}$), кг

$$G_3 = G_2 / (1 - E_{ПА})$$

$$G_3 = 137$$

в тому числі:

Соєве борошно Soya Flour "Albatros on Carp"

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

$$G'_{01} = 28$$

калій фосфорнокислий KH_2PO_4

$$G'_{02} = G_3 (C_2 / C_{\Sigma})$$

$$G'_{02} = 10$$

сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$

$$G'_{03} = G_3 (C_3 / C_{\Sigma})$$

$$G'_{03} = 16$$

сірчаноокислий магній $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$

$$G'_{04} = G_3 (C_4 / C_{\Sigma})$$

$$G'_{04} = 17$$

Кальцій хлористий $CaCl_2$

$$G'_{05} = G_3 (C_5 / C_{\Sigma})$$

$$G'_{05} = 17$$

МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)

$$G'_{06} = G_3 (C_6 / C_{\Sigma})$$

$$G'_{06} = 19$$

Лактоза

$$G'_{06} = G_3 (C_7 / C_{\Sigma})$$

$$G'_{07} = 28$$

Твін 80- полісорбат

$$G'_{06} = G_3 (C_8 / C_{\Sigma})$$

$$G'_{08} = 2$$

Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг

$$G_{\Sigma 3} = 137$$

2.5. Маса сухих речовин у посівному матеріалі, який

необхідний для засівання інокуляторів ($CP_{ПН}$, %), кг

$$G_4 = G_3 \cdot CP_{ПН}$$

$$G_4 = 740$$

2.6. Витрати сухих речовин поживного середовища

($CP_{ПН}$) на приготування посівного матеріалу в

інокуляторах з врахуванням втрат ($E_{ПН}$), кг

$$G_5 = G_4 / (1 - E_{ПН})$$

$$G_5 = 82$$

в тому числі:

Соєве борошно Soya Flour "Albatros on Carp"

$$G''_{01} = G_5 (C_1 / C_{\Sigma})$$

$$G''_{01} = 168$$

калій фосфорнокислий KH_2PO_4

$$G''_{02} = G_5 (C_2 / C_{\Sigma})$$

$$G''_{02} = 60$$

сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$

$$G''_{03} = G_5 (C_3 / C_{\Sigma})$$

$$G''_{03} = 97$$

сірчаноокислий магній $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$

$$G''_{04} = G_5 (C_4 / C_{\Sigma})$$

$$G''_{04} = 104$$

Кальцій хлористий $CaCl_2$

$$G''_{05} = G_5 (C_5 / C_{\Sigma})$$

$$G''_{05} = 104$$

МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	$G''_{06}=G_5(C_6/C_{\Sigma})$	$G''_{06} = 111$
Лактоза	$G''_{07}=G_5(C_7/C_{\Sigma})$	$G''_{07} = 168$
Твін 80- полісорбат	$G''_{08}=G_5(C_8/C_{\Sigma})$	$G''_{08} = 10$
Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг		$G_{\Sigma 5} = 822$

2.7. Маса сухих речовин у посівному матеріалі,

який необхідний для засівання колб ($CP_{\text{КОЛ}}$, %), кг

$$G_6 = G_5 \cdot CP_{\text{КОЛ}} \quad G_6 = 222$$

2.8. Витрати сухих речовин поживного середовища

($CP_{\text{КОЛ}}$) на приготування посівного матеріалу

в колбах з врахуванням втрат ($E_{\text{КОЛ}}$), кг

$$G_7 = G_6 / (1 - K_{\text{КОЛ}}) \quad G_7 = 227$$

в тому числі:

Соєве борошно Soya Flour "Albatros on Carp"	$G''_{01}=G_7(C_1/C_{\Sigma})$	$G''_{01} = 46$
калій фосфорнокислий KH_2PO_4	$G''_{02}=G_7(C_2/C_{\Sigma})$	$G''_{02} = 17$
сірчаноокислий амоній $(NH_4)_2SO_4$	$G''_{03}=G_7(C_3/C_{\Sigma})$	$G''_{03} = 26$
сірчаноокислий магній $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$	$G''_{04}=G_7(C_4/C_{\Sigma})$	$G''_{04} = 29$
Кальцій хлористий $CaCl_2$	$G''_{05}=G_7(C_5/C_{\Sigma})$	$G''_{05} = 29$
МКЦ - індуктор фарм. (ЕР 7.0)	$G''_{06}=G_7(C_6/C_{\Sigma})$	$G''_{06} = 31$
Лактоза	$G''_{07}=G_7(C_6/C_{\Sigma})$	$G''_{07} = 46$
Твін 80- полісорбат	$G''_{08}=G_7(C_6/C_{\Sigma})$	$G''_{08} = 3$
Загальна витрата компонентів поживного середовища, кг		$G_7 = 227$

2.9. Загальні витрати сировини на приготування поживного

середовища для виробничих ферментерів, посівних

апаратів, інокуляторів, качалочних колб, кг

$$G_8 = G + G_3 + G_5 + G_7 \quad G_8 = 6088$$

3. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу

3.1. Об'єм готового поживного середовища та посівного

матеріалу у виробничих ферментерах з врахуванням

втрат при біосинтезі (E_{Φ}), m^3

$$V_{\Phi} = V_{kr}/(1-E_{\Phi})$$

$$V_{\Phi} = 70$$

3.2. Витрати посівного матеріалу на засів виробничих

ферментерів ($X_{B\Phi}$), m^3

$$V_{\Pi M \Phi} = V_{\Phi} \cdot X_{B\Phi}$$

$$V_{\Pi M \Phi} = 7,0$$

3.3. Об'єм готового поживного середовища для

виробничих ферментерів, m^3

$$V_{\Pi C \Phi} = V_{\Phi} - V_{\Pi M \Phi}$$

$$V_{\Pi C \Phi} = 63$$

3.4. Об'єм готового поживного середовища та посівного

матеріалу у посівних апаратах з врахуванням втрат

при культивуванні в посівних апаратах ($E_{\Pi A}$), m^3

$$V_{\Pi A} = V_{\Pi M \Phi}/(1-E_{\Pi A})$$

$$V_{\Pi A} = 6,34$$

3.5. Витрати посівного матеріалу на засів посівних

апаратів ($X_{\Pi A}$), m^3

$$V_{\Pi M \Pi} = V_{\Pi A} \cdot X_{\Pi A}$$

$$V_{\Pi M \Pi} = 0,634$$

3.6. Об'єм готового поживного середовища для посівних

апаратів, m^3

$$V_{\Pi C \Pi} = V_{\Pi A} - V_{\Pi M \Pi}$$

$$V_{\Pi C \Pi} = 5,67$$

3.7. Об'єм готового поживного середовища та посівного

матеріалу в інокуляторах з врахуванням втрат при

культивуванні в інокуляторах ($E_{\Pi H}$), m^3

$$V_{\Pi H} = V_{\Pi M \Pi}/(1-E_{\Pi H})$$

$$V_{\Pi H} = 0,7$$

3.8. Витрати посівного матеріалу на засів інокуляторів

($X_{\Pi H}$), m^3

$$V_{\Pi H M} = V_{\Pi H} \cdot X_{\Pi H}$$

$$V_{\Pi H M} = 0,07$$

3.9. Об'єм готового поживного середовища для

інокуляторів, m^3

$$V_{\Pi C I} = V_{\Pi H} - V_{\Pi H M}$$

$$V_{\Pi C I} = 0,634$$

3.10. Об'єм посівного матеріалу в колбах з врахуванням

втрат при культивуванні в колбах ($E_{\text{кол}}$), м^3

$$V_{\text{кол}} = V_{\text{инм}} / (1 - E_{\text{кол}})$$

$$V_{\text{кол}} = 0,09$$

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

4.1. Розбавлення поживного середовища в інокуляторах
конденсатом пари при його стерилізації (15%), м^3

$$V_{\text{инк}} = (V_{\text{псг}} \cdot 0,15)$$

$$V_{\text{инк}} = 0,10$$

4.2. Витрати води на приготування поживного середовища
в інокуляторах з врахуванням конденсату пари при
стерилізації (15%), м^3

$$V_{\text{вг}} = V_{\text{псг}} - (G_5 / 1000) - V_{\text{инк}}$$

$$V_{\text{вг}} = 0,43$$

4.3. Розбавлення поживного середовища в посівних
апаратах конденсатом пари при його стерилізації
(15%), м^3

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

$$V_{\text{пак}} = 0,85$$

4.4. Витрати води на приготування поживного середовища
у посівних апаратах з врахуванням конденсату пари
при стерилізації (15%), м^3

$$V_{\text{впа}} = V_{\text{псп}} - (G_3 / 1000) - V_{\text{пак}}$$

$$V_{\text{впа}} = 4,62$$

4.5. Розбавлення виробничого поживного середовища
в УБС конденсатом пари при його стерилізації
(20%), м^3

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

$$V_{\text{фк}} = 11,15$$

4.6. Витрати води на приготування виробничого
поживного середовища з врахуванням конденсату
пари при стерилізації у УБС (20%), м

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

$$V_{\text{вф}} = 48,8$$

4.7. Загальна кількість води на приготування поживного
середовища, м^3

$$V_{\Sigma} = V_{\text{ВФ}} + V_{\text{ВПА}} + V_{\text{ВІ}}$$

$$V_{\Sigma} = 53,5$$

5. Розрахунок маси сухих речовин при культивуванні

5.1. Маса сухих речовин в культуральній рідині ($CP_{\text{КР}}$, %), т

$$G_{\text{КР}} = V_{\text{КР}} \cdot CP_{\text{КР}}$$

$$G_{\text{КР}} = 3.01$$

5.2. Втрати сухих речовин при культивуванні, т

$$G_{\text{ВТСР}} = G - G_{\text{КР}}$$

$$G_{\text{ВТСР}} = 0,167$$

5.3. Вихід готової культуральної рідини з ферментерів

з врахуванням втрат ($E_{\text{Ф}}$), м³

$$V_{\text{КР}} = V_{\text{Ф}} - (V_{\text{Ф}} \cdot E_{\text{Ф}})$$

$$V_{\text{КР}} = 56$$

4.2 Матеріальний баланс на одну ферментацію (партію)

Таблиця 4.1 - Матеріальний баланс на одну ферментацію (партію)

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм ³
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
1.1.	Соєве борошно Soya Flour "Albatros on Carp"	168	Поживне середовище (нестерильне)	1252
1.2.	Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	60		
1.3.	Сірчаноокислий амоній $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	97		
1.4.	Магній сірчаноокислий $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	104		
1.5.	Кальцій хлористий CaCl_2	104		
1.6.	МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	111		

1.7	Лактоза	168		
1.8	Твін 80- полісорбат	10		
1.9.	Вода	430		
	Всього	1252	Всього	1252
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В ІНОКУЛЯТОРАХ			
2.1.	Нестерильне поживне середовище	1252	ПС стерилізоване в апараті	1352
2.2.	(Конденсат – 15% води)	100	(втрат немає)	0
	Всього	1352	Всього	1352
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРАХ			
3.1.	ПС стерилізоване в апараті	1352	Посівний матеріал	1352
3.2.	Посівний матеріал з колб	90		90
3.3.	Втрати (частка)		враховані	
	Всього	1442		1442
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ			
4.1.	Соєве борошно Soya Flour "Albatros on Carp"	28	Поживне середовище (нестерильне)	4757
4.2.	Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	10		
4.3.	Сірчаноокислий амоній $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16		
4.4.	Магній сірчаноокислий $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	17		
4.5.	Кальцій хлористий CaCl_2	17		
4.6.	МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	19		
	Лактоза	28		

	Твін 80- полісорбат	2		
4.7.	Вода	4620		
	Всього	4757	Всього	4757
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В ПОСІВНИХ АПАРАТАХ			
5.1.	Нестерильне поживне середовище	4757	ПС стерилізоване в апараті	5607
5.2.	(Конденсат – 15% води)	850	(втрат немає)	0
	Всього	5607	Всього	5607
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНИХ АПАРАТАХ			
1	2	3	4	5
6.1.	Поживне середовище	5607	Посівний матеріал	6241
6.2.	Посівний матеріал з інокулятору	634		
6.3.	Втрати (частка)	0,05	Втрати (кількість)	34
	Всього	6241	Всього	6312
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
7.1.	Соєве борошно Soya Flour "Albatros on Carp"	1004	Поживне середовище (нестерильне)	45091
7.2.	Калій фосфорнокислий KH_2PO_4	359		
7.3.	Сірчаноокислий амоній $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	570		
7.4.	Магній сірчаноокислий $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	620		
7.5.	Кальцій хлористий CaCl_2	620		
7.6.	МКЦ - індуктор фарм. (EP 7.0)	663		

	Лактоза	1004		
	Твін 80- полісорбат	62		
7.7.	Вода			
	Всього	45091	Всього	45091
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
8.1	Нестерильне поживне середовище	63000	Стерильне поживне середовище	74150
1	2	3	4	5
8.2.	(Розбавлення конденсатом – 20%)	11150		
	Всього	74150	Всього	74150
9.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ			
9.1.	Стерильне поживне середовище	74150	Культуральна рідина на фільтрацію	72035
9.2.	Посівний матеріал з посівних апаратів	7000		
9.3.	Втрати (частка)	0,10	Втрати (кількість)	8115
	Всього	81150	Всього	81150

4.3 Розрахунок технологічного обладнання

1. Розрахунок кількості виробничих ферментерів

1.1. Приблизний загальний геометричний об'єм

ферментерів при заданому K_3 , м³

$V_{\Phi\Gamma} = V_{\Phi}/K_3$	$V_{\Phi\Gamma} =$	100
1.2. Вибираємо з таблиці 1 найближчий за об'ємом ферментер, м ³	$V_{\Phi\Gamma} =$	100
1.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 , м ³		
$N_{\Phi P} = K_1 \cdot V_{\Phi\Gamma} / V_{\Phi\Gamma}$	$N_{\Phi P} =$	1,10
1.4. Приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{\Phi\Gamma} + 1$ запасний	$N_{\Phi\Gamma} =$	1
1.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка, $K_{3\Phi}$		
$K_{3\Phi} = V_{\Phi} / (V_{\Phi\Gamma} \cdot N_{\Phi\Gamma})$	$K_{3\Phi} =$	0,63

2. Розрахунок кількості посівних апаратів

2.1. Приблизний загальний геометричний об'єм посівних апаратів при заданому $K_{\text{ПА}}$, м ³		
$V_{\text{ПАГ}} = V_{\text{ПА}} / K_{\text{ПА}}$	$V_{\text{ПАГ}} =$	7,7
2.2. Вибираємо з таблиці 1 найближчий за об'ємом посівний апарат, м ³	$V_{\text{ПАТ}} =$	8
2.3. Кількість посівних апаратів при заданому $K_{\text{ПА}}$, м ³		
$N_{\text{ПА}} = K_1 \cdot V_{\text{ПАГ}} \cdot T_{\text{ЦП}} / (24 \cdot V_{\text{ПАТ}})$	$N_{\text{ПА}} =$	2,20
2.4. Приймаємо до установки посівних апаратів $N_{\text{ПАТ}} + 1$ запасний	$N_{\text{ПАТ}} =$	1
2.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів, частка, $K_{\text{ПАТ}}$		
$K_{\text{ПАТ}} = V_{\text{ПА}} / (V_{\text{ПАТ}} \cdot N_{\text{ПАТ}})$	$K_{\text{ПАТ}} =$	0,58

3. Розрахунок кількості інокуляторів

3.1. Приблизний загальний геометричний об'єм інокуляторів при заданому $K_{\text{ІН}}$, м ³		
$V_{\text{ІНА}} = V_{\text{ІН}} / K_{\text{ІН}}$	$V_{\text{ІНА}} =$	1,27
3.2. Вибираємо з таблиці 1 найближчий за об'ємом інокулятор, м ³	$V_{\text{ІНТ}} =$	1.60
33. Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{ІН}}$, м ³		

$$N_{\text{ІНА}} = K_1 \cdot V_{\text{ІНА}} \cdot T_{\text{ЦІ}} / (24 \cdot V_{\text{ІНТ}})$$

$$N_{\text{ІНА}} = 1,81$$

3.4. Приймаємо до установки інокуляторів

$$N_{\text{ІНТ}} = 1$$

$N_{\text{ІНТ}} + 1$ запасний

3.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці

інокуляторів, частка, $K_{\text{ІНТ}}$

$$K_{\text{ІНТ}} = V_{\text{ІН}} / (V_{\text{ІНТ}} \cdot N_{\text{ІНТ}})$$

$$K_{\text{ІНТ}} = 0,43$$

4. Розрахунок кількості збірників культуральної

Рідини

4.1. Приблизний загальний геометричний об'єм збірника

при заданому $K_{\text{ЗБ}}$, м^3

$$V_{\text{ЗБ}} = V_{\text{КР}} / K_{\text{ЗБ}}$$

$$V_{\text{ЗБ}} = 69,7$$

4.2. Вибираємо з таблиці 1 найближчий за об'ємом

збірник, м^3

$$V_{\text{ЗБТ}} = 40$$

4.3. Кількість збірників при заданому $K_{\text{ЗБ}}$, м^3

$$N_{\text{ЗБ}} = K_1 \cdot V_{\text{ЗБ}} / V_{\text{ЗБТ}}$$

$$N_{\text{ЗБ}} = 1,91$$

4.4. Приймаємо до установки збірників $N_{\text{ЗБТ}} + 1$ запасний

$$N_{\text{ЗБТ}} = 2$$

4.5. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з

таблиці збірників, частка, $K_{\text{ЗБТ}}$

$$K_{\text{ЗБТ}} = V_{\text{КР}} / V_{\text{ЗБТ}} \cdot N_{\text{ЗБТ}}$$

$$K_{\text{ЗБТ}} = 0,70$$

4.4 Зведена таблиця результатів розрахунку

Таблиця 4.2- Результати розрахунку

№ з/п	Найменування показника	Один. виміру	Умов. познач.	Значення
1	2	3	4	5
	Культура біологічного агента – <i>Trichoderma reesei</i>			
1.	Потужність підприємства в умовних тоннах ферменту	ум. т/рік	$G_{\text{УТ}} =$	50
2.	Кількість робочих днів у рік	дн.	$T_{\text{РД}} =$	308

3.	Стандартна активність препарату	од./г	$A_{CT} =$	3500
4.	Умовна активність препарату	од./г	$A_{УО} =$	5000
5.	Активність культуральної рідини	од./мл	$A_{KP} =$	12
6.	Час циклу роботи ферментера	год.	$T_{ЦФ} =$	144
7.	$T_{ЦП}$ – час циклу роботи посівного апарата	год.	$T_{ЦП} =$	50
8.	$T_{ЦІ}$ – час циклу роботи інокулятора	год.	$T_{ЦІ} =$	50
9.	Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл)	м ³	$V_{KP} =$	55,75
10.	Кількість ферментацій (циклів) на рік	цикл/рік	$N_{ЦК} =$	51,3
11.	Кількість фермента у натур. кг за цикл, кг/цикл	кг/цикл	$G_{ЦК} =$	1384
12.	Вихід фермента у натуральних кг з 1 м ³	нат. кг/м ³	$q_{НАТ} =$	24,8
13.	Вихід фермента в умовних кг з 1 м ³	ум. кг/м ³	$q_{УМ} =$	17,36
14.	Об'єм виробничого ферментера	м ³	$V_{ФГ} =$	100
15.	Кількість виробничих ферментерів	од.	$N_{ФГ} =$	1
16.	Об'єм посівного апарату	м ³	$V_{ПАТ} =$	8
17.	Кількість посівних апаратів	од.	$N_{ПАТ} =$	1
18.	Об'єм інокулятора	м ³	$V_{ІНТ} =$	1,6
19.	Кількість інокуляторів	од.	$N_{ІНТ} =$	1
20.	Об'єм збірника	м ³	$V_{ЗБТ} =$	40
21.	Кількість збірників	од.	$N_{ЗБТ} =$	2

Постадійна схема виробництва наведена у додатку 1. Удосконалена апаратурна схема отримання препарату β – глюканази Г20Х наведена у додатку 2.

Специфікація обладнання – у додатку 3.

4.5 Наукові дослідження

*Оптимізація складу поживного середовища *Trichoderma reesei**

У зв'язку із зростанням попиту на ферменти геміцеллюлазного комплексу в різних галузях промисловості актуальною стала потреба в розробленні нових та удосконаленні вже існуючих технологій їх виробництва. Одним із важливих засобів інтенсифікації їх біосинтезу є підбір оптимальних умов культивування продуцентів.

Найбільш доступним і практично необмеженим джерелом одержання ферментів у промисловому масштабі є мікроорганізми: бактерії, актиноміцети, дріжджі, гриби. Основними продуцентами целюлолітичних ферментів є гриби *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *Aspergillus terreus*, *A. foetidus* та ін. Велике значення для мікроорганізмів - продуцентів ферментів мають такі фактори як кислотність, температура, насичення киснем, умови перемішування, макроеlementи, мікроеlementи, вуглецева складова, джерела азоту та присутність речовин індукторів у культуральному середовищі. Дослідниками різних країн проводились вивчення впливу цих факторів на вихід та активність ферментів.

У роботі [63] досліджено вплив різних джерел вуглецю на активність ендо-1,4- β -глюканази та ксиланази. Було показано, що штучні середовища на основі лактози, целюлози та L-сорбози ефективності можна порівняти з натуральними – на основі ксиланів вівса та пшеничних висівок [89]. Для біосинтезу ксиланаз, окрім вище зазначених джерел вуглецю, який може бути індуктором синтезу гідролаз полісахаридів, необхідне ще й джерело азоту. Причому у разі використання білка як джерела азоту він може стати одночасно і джерелом вуглецю, який в свою чергу може бути індуктором синтезу гідролаз полісахаридів. Наявність надлишку білка у поживному середовищі може викликати синтез продуцентом протеаз, що вкрай небажано при цільовому біосинтезі гідролаз полісахаридів. Тому питання оптимізації джерела азоту не

менш важливе [90]. Вивчався вплив різноманітних джерел азоту на продукцію екзоферментів *T. reesei*. Показано, що середовище, яке містить комплексні джерела азоту: протеолізат пептону та екстракт дріжджів, є кращим як для біосинтезу ендоглюканази, так і ксиланази. Протеолізат пептону містить незамінні амінокислоти, а екстракт дріжджів є добрим джерелом комплексу вітамінів групи В [90].

Ладижинське ДП «Ензим» для виготовлення ФП «Беталад» на основі *Trichoderma reesei* застосовує саме такі комплексні ПС, де як основний вуглецевий компонент застосовує соєве борошно. До складу середовища входять також лактоза, солі магнію, кальцію, цинку, амонію та заліза. У якості індуктора до складу середовища додають МКЦ (мікроцелюлоза) згідно технологічного регламенту. У даному середовищі *Trichoderma reesei* продукує комплекс ферментів ксиланазу, ендо-1,4- β -глюканазу, целюлазу. Соєве борошно містить високу масову частку протеїнів, що за твердженням дослідників [90] може викликати синтез протеаз, що є не бажаним. Індуктор МКЦ, який застосовує це виробництво, стимулює синтез активної ксиланази, оскільки більше орієнтований для застосування у агропромисловому комплексі. Логічно було б додавати у ПС іншу речовину - індуктор, що стимулював би синтез більш активної екзо- та ендоглюканази, оскільки ФП планується для застосування у пивоварінні. Підвищений вміст у ПС β -глюкану, який відсутній у соєвому борошні, стимулюватиме на нашу думку синтез саме активних β -глюканаз.

Огляд хімічного складу деяких видів борошна – показав, що вівсяне борошно містить велику кількість білкових речовин (близько 10 %) та жирів при невеликій кількості крохмалю, всі незамінні амінокислоти, вітаміни групи В, Е, А, ферменти, моносахариди, мікроелементи, які грають важливу роль в обміні речовин та харчові волокна (а саме, клітковину). Білок вівсяного борошна, багатий на лізин (амінокислотний скор по лізину – 71 %) , метіонін, триптофан; в ньому підвищений вміст К, Mg і Fe, клітковини. Особливостями

його вуглеводного складу, як відомо, є наявність розчинних полісахаридів: пентозанів (до 14,0 %), левулезану (до 2,0 %), а також β -глюкану, що становить більшу частину геміцелюлоз вівса [91,92].

Хімічний склад деяких зернових культур наведено у розділі II даної роботи.

Заміна частини соєвого борошна на вівсяне стимулювала б саме продукування активної β -глюканази.

Метою наукового дослідження стало спростувати або підтвердити припущення про те, що корегування складу ПС за рахунок підвищення вмісту β -глюкану у ПС стимулюватиме синтез *Trichoderma reesei* потрібного нам ферменту. Дослідження проводили в біотехнологічній та мікробіологічній лабораторіях кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування Одеського національного технологічного університету.

Об'єктом дослідження був штам *Trichoderma reesei*, який надано з колекції мікроорганізмів Ладижинського ДП «Ензим». Культивування здійснювали на поживних середовищах, склад яких підібрано згідно технологічного регламенту цього підприємства з заміною частини соєвого борошна на вівсяне. Для культивування використовували поживне середовище такого складу, г/л: соєве борошно – 16,2, KH_2PO_4 – 5,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 9,2, CaCl_2 – 0,76 MgSO_4 – 0,003, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,76, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, ZnSO_4 – 0,003, CaCl_2 – 0,004, лактоза – 16,2, твін – 1.0. Вирощували посівний матеріал на поживному середовищі аналогічного складу протягом 6 діб. Були підготовлені три зразки поживного середовища з різним співвідношенням соєвого та вівсяного борошна – 1:1, 2:1, 1:2 відповідно. Контролем слугувало середовище тільки з соєвим борошном. Посівний матеріал у колби вносили у кількості 10% до об'єму поживного середовища. Для встановлення оптимальних умов синтезу ферментів штам вирощували у колбах Ерленмейера (750 мл) з об'ємом поживного середовища 200 мл, за швидкості

обертання качалки 160 і 220 об/хв і температури 30 °С. Динаміку накопичення ферментів, зміну рН у культуральній рідині визначали кожні 24 години протягом 144 годин повного терміну культивування. Екзоглюканазну активність визначали за адаптованою методикою Мандельса і Вебера, щодо мікроміцетів як об'єктів дослідження, засновану на принципі відновлення редукуючих цукрів, з використанням гексоціаноферату калію. Активність ендоглюканаз визначали віскозиметрично за допомогою віскозиметра Оствальда 0,73 мм (рис.4.1) за зниженням в'язкості 0,3%-вого розчину Na-КМЦ [93]



Рис.4.1 Віскозиметр Оствальда

Результати досліджень наведені на рис. 4.2

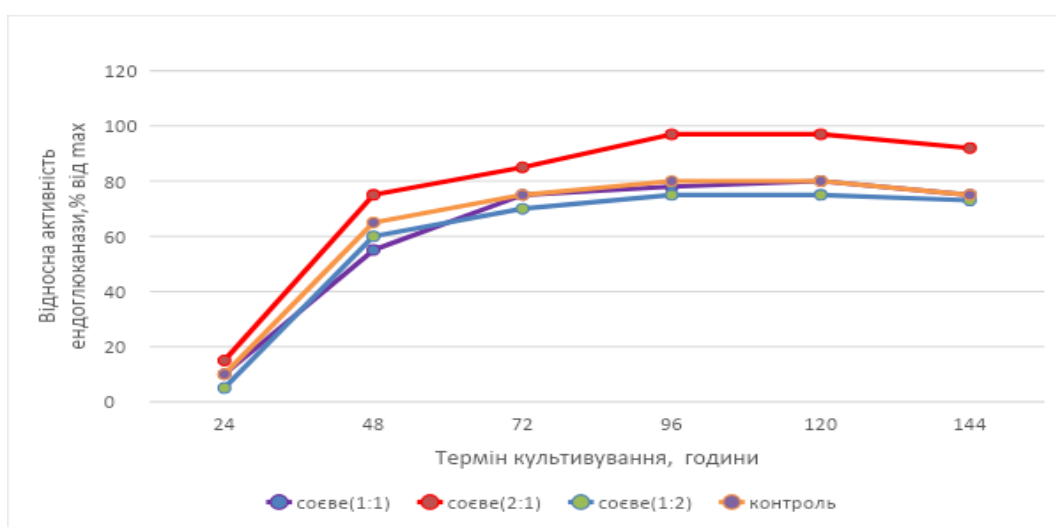


Рис. 4.2 Активність ендоглюканаз при культивуванні на різних поживних середовищах

Експериментально встановлено, що співвідношення масових часток соєвого та вівсяного борошна 2 : 1 у культуральному середовищі позитивно впливає на зростання гідролітичної активності ендоглюканази, синтезованої штамом *Trichoderma reesei*. Активність ензиму у цьому зразку зростає на 21,0 %. Це можна пояснити тим, що підвищення частки β -глюкану у композиції з рештою складників ПС стимулює продуцент до виділення у навколишнє середовище більш активної β -глюканази. Піку своєї активності фермент досягає вже через 96 годин культивування продуцента. Активність ферментів у дослідному зразку, де співвідношення масових часток соєвого та вівсяного борошна у культуральному середовищі було 1: 2, була на 6,0 % нижча ніж у контролі. Пояснюється це тим, що за рахунок додавання вівсяного борошна знижується вміст білкової складової і, певною мірою, загальмовується біосинтетичні процеси утворення білка продуцентом, що призводить до зниження гідролітичної активності відносно контрольного варіанту. У зразку, де співвідношення масових часток соєвого та вівсяного борошна у культуральному середовищі складало 1: 1, на 96 годину активність фермента була такою ж як і в контрольному зразку.

Аналіз редукуючих цукрів. До 120 мкл (1мкл =0,001мл) досліджуваної проби додавали 1200 мкл дистильованої води та 600 мкл DNSA(діазонієва сіль -діазо-2-нафтол-4-сульфонова кислота). Проби витримували 10 хвилин при 100 °С, потім 5 хв. за 0 °С. Після цього додавали у всі проби по 6 мл дистильованої води та вимірювали оптичну густину за 540 нм. Як контроль використовували дистильовану воду.

Визначення біомаси продуцента. 1 мл культуральної рідини висушували при 105°C і зважували суху біомасу.

Отримані результати наведені на рис. 4.3

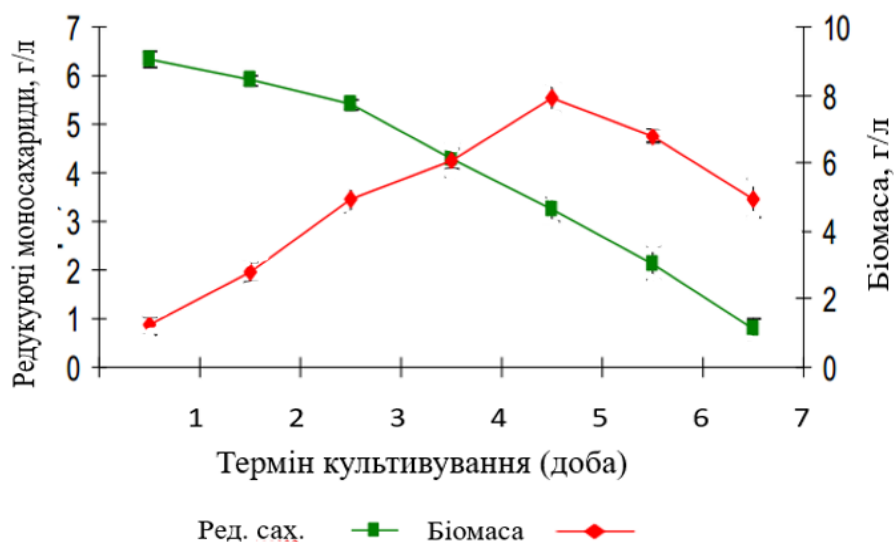


Рис.4.3 – Динаміка зниження редукуючих цукрів культурального середовища *Trichoderma reesei* протягом 6 діб культивування.

Дослідження зміни редукуючих сахаридів та приріст біомаси у культуральній рідині в процесі ферментації продуцента свідчить, що культура динамічно розвивається. Вміст цукрів, що редукують, знижується протягом усього процесу. Початкова концентрація цукрів знижується з 6,5 г/л до 1,1 г/л до кінця процесу. Максимальну біомасу маємо між 4 та 5 добою культивування.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Підтверджена можливість вдосконалення біотехнології одержання ферментних препаратів із підвищеною ендоглюканазною активністю шляхом культивування штаму *Trichoderma reesei* через заміну у поживному середовищі однієї третини соєвого борошна на вівсяне.

2. Додавання вівсяного борошна, багатого на β -глюкан дало позитивний результат щодо підвищення ендоглюканазної активності в культуральній рідині. Активність ензиму при цьому зростає на 21,0 %.

3. Піку своєї активності фермент досягає вже через 96 годин культивування продуцента.

4. Зниження рівня рН, що спостерігається на другу добу культивування *Trichoderma reesei*, потребує постійного додавання у ПС аміачної води для підтримання цього параметру на постійному рівні.

4.6 Викладення удосконаленого технологічного процесу отримання β -глюканаз (загальні вимоги)

ДР1 Санітарна підготовка виробництва включає в собі кілька етапів, які включають наступне: підготовка персоналу, приготування виробничих приміщень, підготовка обладнання та комунікацій, і приготування дезінфікуючих розчинів.

У підготовці до виробничого процесу біосинтезу важливу роль відіграють всі зазначені етапи. Перед тим як розпочати роботу, обслуговуючий персонал проводить необхідну санітарну підготовку виробництва і проходить процедуру санітарно-гігієнічної обробки. Крім того, при прийомі на роботу і регулярно, щорічно, персонал, який безпосередньо працює у виробництві біотехнологічних препаратів, повинен пройти медичний огляд, отримати систематичну навчання з питань санітарно-гігієнічних вимог і дотримуватися правил особистої гігієни.

Підготовка одягу

Кожен працівник, який працює у виробничому цеху, має бути постачений чотирма комплектами санітарного одягу. Заміна одягу проводиться щоденно або при необхідності, коли він стає забрудненим. Перед розпочатком роботи працівники повинні одягти чистий санітарний одяг, прикрити волосся хусткою або носити ковпак, зняти прикраси, видалити лак з нігтів, а також тщательно вимити руки теплою водою з милом та проантисептувати їх.

Кожен працівник на підприємстві має особисту відповідальність за дотримання правил особистої гігієни, збереження належного стану робочого місця та дотримання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці роботи.

Технологічний одяг, що використовується персоналом, відповідає класу чистоти зони, в якій працівник працює, і виконує свою основну функцію - максимально захищає вироблені продукти від потрапляння частинок.

У приміщеннях класів А і В згідно з вимогами GMP, персонал повинен носити стерильний брючний костюм або комбінезон, хустину або ковпак, бахіли, маску, гумові або пластикові рукавички. Для зони С чистоти необхідний косинка, брючний костюм та бахіли. У зоні D чистоти використовується халат або брючний костюм, технологічне взуття та косинка.

Підготовка мийних розчинів

Приготування всіх мийних і дезінфікуючих розчинів та сумішей здійснюється в блоках стерилізації або за дорученням начальника цеху, ділянки або підрозділу згідно з офіційним наказом.

У реакторах, через встановлений на трубопроводі дозатор (вимірювач об'єму), подається необхідна кількість дезінфекційного або мийного розчину (таких як каустична сода, перекис водню, дексоцид), який змішується з водою, що дозується за допомогою об'ємного датчика. Після 10 хвилин змішування отримуємо розчини, які використовуються для миття та дезінфекції обладнання та комунікацій.

Підготовка розчину каустична сода

Для здійснення миття та дезінфекції обладнання використовується 2% розчин каустичної соди. Для приготування 1 літра такого розчину беруть приблизно 20 г сухої каустичної соди і додають до цього приблизно 980 мл води. Отриманий розчин зберігають у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці.

Приготування розчину «Дезоксон-1»

"Дезоксон-1" - препарат, що містить надоцтову кислоту, проявляє високу бактерицидну, фунгіцидну та спороцидну активність і

використовується для дезінфекції рук. "Дезоксон-1" закуповується та зберігається на складі. Він розведений водою до необхідної концентрації перед використанням.

Санітарна обробка "чистих" зон здійснюється відповідно до письмової програми. У разі проведення дезінфекції застосовуються різні типи дезінфікуючих розчинів. Зокрема, серед використовуваних розчинів можна виділити:

- розчин перекису водню (3%, 6%);
- розчин «Гембар»(5%);

Щоденне прибирання

Для обробки технологічних приміщень, використовують розчин перекису водню з масовою часткою 3% і мийний засіб. Якщо протягом місяця при систематичному використанні цього розчину стан повітря в приміщенні відповідає потрібному класу чистоти, то масова частка перекису водню може бути зменшена до 1%. У разі виявлення грибків або спор в повітрі приміщення, масову частку перекису водню в робочому розчині слід збільшити до 6%.

Щоденне прибирання повинно проводитись вологим способом після кожної зміни. Поверхні слід мити поступовими рухами, захоплюючи кожного разу 1/3 площі, яка була вже протерта губкою, насиченою робочим розчином у кількості 100-150 мл на квадратний метр. Після цього підлогу також слід вимити цим же розчином. Не менше, ніж за 30 хвилин до початку роботи, слід увімкнути приточну вентиляцію, а потім витяжну вентиляцію. Після прибирання, інвентар має бути знезаражений у розчині хлорантаїну протягом 2-3 годин.

Генеральне прибирання приміщень

Генеральне прибирання виробничих приміщень проводиться раз на 5-6 днів. Під час цього прибирання очищають підлоги, стіни, стелі, повітроводи,

підвіконня, всі поверхні обладнання, комунікації та виробничі меблі. Для обробки використовується розчин перекису водню з масовою часткою 6% та миючим засобом. У разі відсутності спор та грибків протягом місяця в приміщенні, масову частку перекису водню можна знизити до 3%. Мікробіологічний контроль здійснюється за допомогою методу змивів з поверхонь за допомогою стерильних тампонів не рідше одного разу на тиждень протягом виробничого процесу. В змивах з 100 см² поверхні допускається наявність не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох чашках Петрі.

Підготовка обладнання

Інвентар, що застосовується для миття і очищення, слід вибрати і використовувати так, щоб він не став джерелом контамінації. При очищенні технологічного обладнання, використовують засоби (Неоформ, розчин етилового спирту 3%, 6%) та інвентар призначені виключно для цих цілей.

ДР2 *Стерилізація повітря*, яке подається у інокулятор та основний ферментер відбувається за схемою наведеною на рис.13.

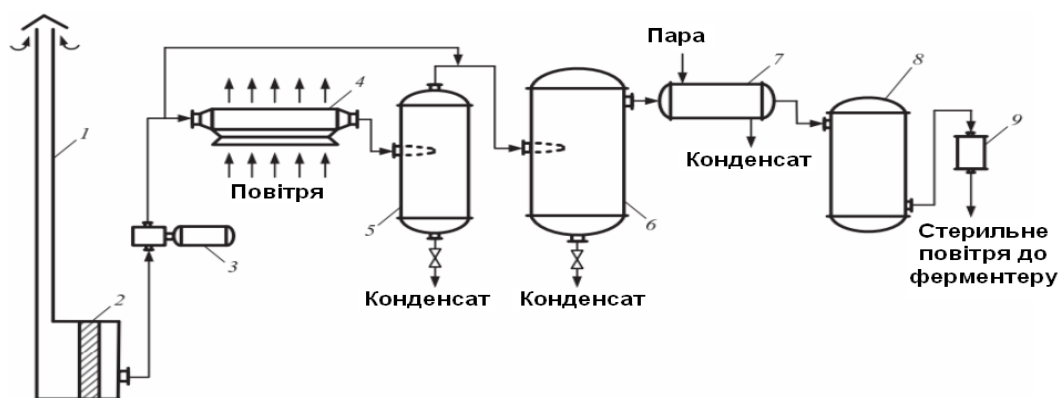


Рис. 4.4 - Принципова апаратурна схема очищення повітря до ферментації:

1 – забір повітря; 2 – фільтр комірковий; 3 – компресор; 4 – теплообмінник; 5 – краплевлловлювач; 6 – ресивер; 7 – теплообмінник; 8 – фільтр(головний) грубого очищення; 9 – фільтр тонкого очищення

Повітря стерилізується додатково на індивідуальних фільтрах 9, які встановлено безпосередньо перед інокуляторами та основними ферментерами.

ДР3 Підготовка поживного середовища. Поживне середовище для культивування у інокуляторі 8 та у основному ферментері 10 готують наступним чином. Сухе вівсяне зерно подрібнюють на молотковій дробарці 1 до розміру часток 0,8 – 1.0 мм і разом з соєвим борошном замочують у воді, витримують у збірнику не менше 2 годин для набухання. Потім у збірник 2 подають необхідні розчини солей та піногасник. Суміш стерилізують. Стерилізація ПС відбувається у збірнику або безпосередньо у інокуляторі за рахунок подавання перегрітої пари за температури 120°C протягом 40 хвилин. Потім ПС охолоджується до 80°C стерильним повітрям і тільки після цього охолоджувальним агентом, який подають у сорочку інокулятора для досягнення оптимальної температури вирощування. Охолоджувальним агентом слугує, як правило вода.

ДР4 Приготування розчинів поживних солей. Розчини поживних солей готують у окремих збірниках та подають у збірник ПС 2, інокулятор або ферментер при складці компонентів у розрахованих кількостях.

ТП5 Підготовка засівної культури. Засівну культуру вирощують спочатку на скошеному агаризованому середовищі Чапека наступного складу на 1дм³ дистильованої води: сульфат магнію $MgSO_4$ – 0,5 г, безводний фосфат калію KH_2PO_3 - 1,0 г, хлорид калію KCl – 0,5 г, сульфат заліза $FeSO_4$ – 0,01 г, нітрат натрію $NaNO_3$ – 2,0 г, декстроза – 30 г, агар – 20 г. Нарощування засівної культури відбувається за схемою з поступовим накопиченням спорової маси (рис.3) Вирощування проводять у термостаті до рясного спороутворення при температурі 28-30°C. Змивання спор грибної культури зі скошеного агару здійснюють з додаванням препарату «Твін». Другий етап відбувається на тому ж середовищі і при тих же умовах, але в колбах, які містять до 100 г рихлого середовища (зволожені висівки, соєве борошно). На третьому етапі також у колбах, але вже на 500 г середовища.

Накопичення спорової маси до необхідного об'єму триває протягом 6–10 діб. Спорову засівну культуру витримують 12 годин в сольовому розчині, що містить іони кобальту і марганцю для активації, і в кількості 0,2-0,3 % за об'ємом використовують для засівання інокулятора.

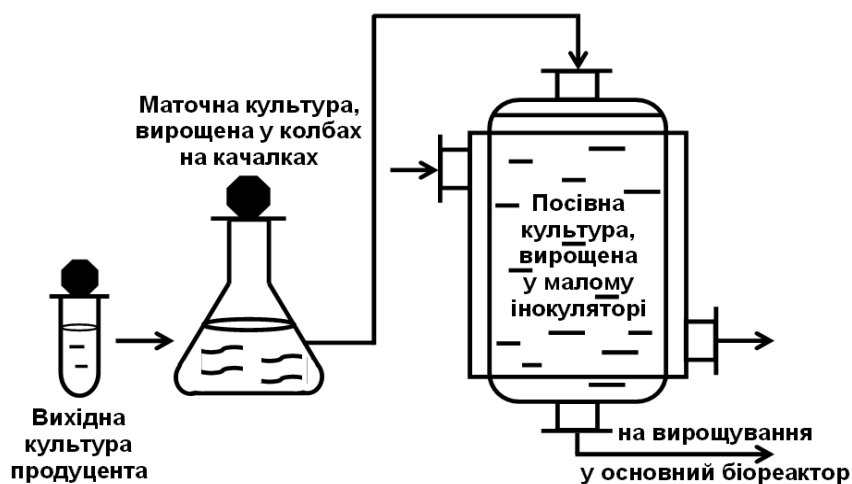


Рис. 4.5 - Схема нарощування біомаси посівної культури

Вирощування культури *Trichoderma reesei* в інокуляторі 8 відбувається за температури 22–34°C при pH 3,7 до 4,7 протягом 28–36 годин на рідкому поживному середовищі, яке за концентрацією поживних речовин складає 0,5 % від їх концентрації у основному ферментері. Інокулятор 8 також має бути оснащений складним перемішуючим пристроєм (не більше 30 – 60 об/хв для того, щоб запобігти надлишкових зрізових зусиль) та барботажним подаванням стерильного повітря у об'ємі 0,5 м³/год на 1м³ ПС на початку ферментації і 0,8 – 1.0 м³/год на 1м³ ПС через дві доби вирощування продуцента.

ТП 7 Основний процес вирощування продуцента. Молоду (48 годин вирощування) засівну культуру з інокулятора подають у основний ферментер 10 у об'ємі, який складає до 10 % від ємності основного ферментера. Середовище для культивування містить з розрахунку на 1 м³ наступні складники: Соеве борошно - 10,8 кг/м³ ; Вівсяне борошно - 5.4 кг/м³ ; КН₂РО₄ - 5,8 кг/м³; (NH₄)₂SO₄ - 9,16 кг/м³; CaCl₂ -0,76 кг/м³; MgSO₄ x7H₂O - 0,76 кг/м³; MgSO₄ (ФАРМ) - 3.06 г/м³; FeSO₄·7H₂O - 0,05 г/м³;

ZnSO₄ - 2.6 г/м³; CoCl₂ - 3,76 г/м³; МКЦ – інд. -10,76 кг/м³; Лактоза (Prom) - 16.2 кг/м³; Твін 80 - 1.0 кг/м³.

Вирощування культури відбувається при перемішуванні з невеликими обертами перемішувального пристрою (30–60 об/хв.) та барботажним способом подавання стерильного повітря. Процес основного культивування перших кілька діб відбувається за температури 30-32°C, а далі температуру знижують до 22°C. Процес відбувається за рН 3,7-4,7 протягом 4–6 діб. У процесі вирощування кислотність середовища знижується до рН 2,5–3,0, тому у основний ферментер протягом всього процесу подається до 1.5 тонни підживлюючого середовища та 200-210 дм³ аміачної води 25 % концентрації. Культура активно починає виділяти позаклітинні високоактивні ендо-1,3- β та ендо-1,4- β -глюканази. Культивування ведуть до 12 одиниць активності у КР.

ТП 8 Виділення та очищення препарату з *Trichoderma reesei*

Культуральну рідину разом з продуцентом перетискають стисненим повітрям (0,35 МПа) у збірник 14, зі збірника на сепарацію 15, де відділяють з КР гіфи грибною культури і очищений від гіфів розчин знову направляють у збірник 16. Зі збірника розчин ферменту фільтрують спочатку на рамному фільтрі 17 з застосуванням картону (FibraFix®, Італія, товщиною 2 – 4 мм, з целюлози бавовника низької зольності), а потім на ультрафільтраційній установці 18 з керамічними фільтрами ECOSOFT UF-30. На ультрафільтраційну установку рідина яка містить цільовий фермент подається під тиском 0,6 – 1,0 МПа. За рахунок такої швидкості подавання легкі сполуки проскакують мимо отворів керамічного фільтру, а ферменти з молекулярною масою до кількох мільйонів Да провалюються у ці пори, не втрачаючи при цьому своєї активності. Активність ферменту у розчині може досягати 40–50 одиниць. Активність ферменту визначають за ГОСТ 34176-2017 «Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности эндо- β -глюканазы» або за ДСТУ 8484:2015 «Препарати ферментні. Методи визначання активності ».

ТП 9 Приготування препаративної форми продукту. У збірник концентрованого ферментного препарату для стабілізації додають CaSO_4 та NaCl . Ці солі не тільки стабілізують препарат а й захищають від втрати активності при висушуванні у розпилювальній сушарці 19. При температурному режимі сушильного агента 140°C на вході і 70°C на виході втрати ферментів β -глюканаз не перевищує 4-6%. У результаті можна отримати ферментний препарат з прогнозованою активністю 3500–5000 одиниць.

ПМВ 10 Фасування, пакування. Фасують препарат у мішки, пакети вагою 0,5-10 кг, та наносять маркування, на якому вказують відповідну до продукту характеристику.

ПВ11 (переробка відходів) 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 [ДСП-201-97. «Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць» (від забруднення хімічними та біологічними речовинами)]

Тверді відходи підлягають автоклавуванню, а потім зазвичай викидаються на звалище. Охорона ґрунту від забруднень повинна відповідати СанПіН 42-128-49-690 [СанПиН 42-128-49-690 «Санитарные правила содержания территорий населенных мест»]. 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 мають, наприклад, корозійну дію. 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 [СанПіН 4630 «Санітарні правила та норми охорони поверхневих вод від забруднення»]. Вплив же на характер стоків і на їх безпеку (або небезпеку) таких факторів, як внутрішньоклітинні матеріали і ендотоксини, з'ясовано поки тільки частково.

ЗВ (знешкодження відходів). Відходами на виробництві препаратів полігалактуроноз є концентрат міцелію гриба - продуцента видалений під час сепарації та залишки КР після виділення і очищення ферментів . Залишки рідини безпечно можна направляти у каналізацію, а міцелій можна висушувати на барабанних або стрічкових сушарках та після подрібнення застосовувати як органічний сорбент, але це потребує додаткових досліджень.

4.7 Схема постадійного контролю біосинтезу β – глюканази Г20Х з *Trichoderma reesei*

Всі стадії контролю на виробництві ферментних препаратів є типовими є наведені таблиці 4.3.

Таблиця 4.3 - Схема постадійного контролю біосинтезу пектолітичних ферментів

Назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Приготування робочого розчину	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготуван-ня розчину	C = 0,3%

Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Миття з'ємних частин обладнання	З'ємні частини обладнання, мийний розчин, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції	$t = 45^{\circ}\text{C}$
Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	$t = 45^{\circ}\text{C}$, $\tau = 1-2 \text{ год}$
Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	$z = 0,07 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$
Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $\tau = 1 \text{ год}$
Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90\%$, тиск згідно паспорту
Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після пресування повітря	$P = 0,35-0,5 \text{ МПа}$ $t = 220-250^{\circ}\text{C}$
Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	$t = 25-40^{\circ}\text{C}$
Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	$W = 60\%$

Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 40^{\circ}\text{C}$
Тонке очищення повітря	Очищення повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	$E = 99,996\%$
Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищення повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	$E = 99,999\%$
Приготування та стерилізація поживного середовища	Поживне середовище, температура, час, рН, стерильність	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти, рН 7
1	2	3	4	5
Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти

Виробничий біосинтез	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіоло-гічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, мікробіоло-гічний контроль, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Під час вирощування культури у ферментері	$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти, $C_6 = 42,7$ г/л
Фільтрування	Температура, швидкість, режим	Термометр, технічний метод	Безперервно після ферментування	$t = 30^{\circ}\text{C}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Сепарування	pH, стерильність	pH-метр, мікробіоло-гічний контроль	Мікробіоло-гічний контроль після фільтрування	pH = 7, відсутність сторонньої мікробіоти
Термічна обробка	Температура, тривалість термічної обробки	Термометр технічний, годинник	Під час термічної обробки	$t = 60^{\circ}\text{C}$, $\tau = 2-3$ год
Сушка	Температура, після видалення зайвої вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	$t = 20-25^{\circ}\text{C}$, $W = 10\%$

РОЗДІЛ 5.

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

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

Проблема профілактики негативного впливу біологічних факторів у виробничому середовищі на здоров'я людини та навколишнє природне середовище набуває все більшої важливості з погляду соціально-гігієнічних та медико-біологічних аспектів.

Під час отримання ферментів великі обсяги води та повітря забруднюються мікроорганізмами-продуцентами, органічними та мінеральними речовинами. Склад стічних вод та відпрацьованого повітря дуже складний.

У процесі виробництва ферментів робітники піддаються впливу таких виробничих факторів, як мікроклімат та біологічні агенти, до яких входить складний органічний пил з живими клітинами або їх фрагментами [100,101].

Вивчення мікробіоти повітря має велике значення з погляду санітарно-гігієнічних та фітопатологічних аспектів. Підвищена концентрація бактерій у повітрі виробничих приміщень під час виробництва ферментів негативно впливає на здоров'я працівників. Коли спори окремих мікроорганізмів потрапляють у легені під час дихання, вони можуть осідати на слизових оболонках та спричиняти їх ураження через заселення та виділення токсичних речовин. Серйозність захворювання та його клінічні прояви залежать від кількості спор у повітрі, чутливості та імунного статусу організму [100, 107].

Згідно з науковою літературою, вплив на здоров'я працюючих здійснюється не тільки за рахунок спорів або клітин бактерій, але також через клітинні фрагменти, яким зазвичай приділяють мало уваги. Дослідження показали, що дрібні частинки розміром менше 2,5 мікрметра мають значний

вплив на здоров'я людей. Виявлено, що значна кількість імунологічно активних частинок мають розміри суттєво менші, ніж спори, що виділяються з поверхонь, забруднених грибами. Дуже маленькі частинки розміром 0,3 мікрметра перевищують кількість спор більш ніж у 320 разів. Проблема полягає в тому, що виявлення таких частинок є складним завданням, оскільки дрібні й дуже дрібні клітинні фрагменти не можна виявити традиційними методами дослідження біоаерозолів.

Бактеріальні клітини можуть викликати хвороби алергійного характеру. У людей зі серйозними імунодефіцитними станами може спостерігатися пряма інфекція. Основними шляхами потрапляння бактерій та їх спор в організм є шлунково-кишковий тракт та органи дихання [105 - 107]

5.2 Методи очищення стічних вод при виробництві ферментів

З метою запобігання забрудненню навколишнього середовища важливо проводити очищення стічних вод на підприємствах, що займаються виробництвом ферментів.

5.2.1 Механічні методи усунення забруднень

Механічний метод очищення стічних вод полягає у видаленні механічних домішок (нерозчинних) зі стічних вод. Механічна очистка дозволяє видалити до 60-75% нерозчинних домішок зі стічних вод. Цей метод є найбільш економічно вигідним.

Обладнання для механічного очищення стічних вод включає решітки (або УФС - установку фільтрувальну самоочищувальну) і сита, пісколовки, первинні відстійники та мембранні елементи [105 - 107].

Для затримки великих частинок органічного і неорганічного походження застосовують решітки і сита, з максимальною шириною до 16 мм. Далі стоки проходять через пісколовки, де відбувається осадження дрібних

частинок під впливом сили тяжіння, і жировики, які допомагають видалити з поверхні води гідрофобні речовини шляхом флотації.

Для видалення дуже малих частинок зі стічних вод застосовують фільтрування шляхом пропускання через шар зернистого матеріалу. Досить поширеними є мембранні фільтри. Після такого очищення стічні води направляють на первинні відстійники для видалення зважених частинок, здебільшого органічного походження [105 -107].

5.2.2 Фізико-хімічні методи усунення забруднень

Фізико-хімічне очищення стічних вод передбачає введення реагента (кагулянта чи флокулянта) у стічні води. Цей реагент взаємодіє з домішками, що містяться у воді, і сприяє повному видаленню нерозчинних домішок, колоїдів і частинок розчинних сполук [101- 107].. Це дозволяє знизити концентрацію шкідливих речовин у стічних водах, перетворити розчинні сполуки на нерозчинні або менш шкідливі речовини, змінити характеристики стічних вод (нейтралізація і т. д.). Залежно від необхідного ступеня очищення стічних вод, фізико-хімічне очищення може бути завершальною або передбічною стадією перед біологічним очищенням.

Фізико-хімічне очищення стічних вод включає різноманітні методи, серед яких найпоширенішими є кагуляція, окиснення, сорбція, екстракція та інші [101 - 107].

5.2.3 Біологічні методи усунення забруднень

Серед методів очищення стічних вод велику роль відіграє біологічний метод, який базується на використанні закономірностей біохімічного та фізіологічного самоочищення річок та інших водойм. Біологічне очищення передбачає розклад органічних речовин стічних вод за допомогою мікроорганізмів, таких як бактерії та найпростіші організми [101].. На цьому етапі відбувається мінералізація стічних вод та видалення органічного азоту і

фосфору [101]. В процесі біологічного очищення можуть використовуватися як аеробні, так і анаеробні організми.

Очисні установки біологічного очищення можна розділити на два основних типи.

- Перший тип - це аеробні очисні системи, де процеси відбуваються у наявності кисню. У таких системах мікроорганізми, зокрема бактерії, розкладають органічні речовини, використовуючи кисень для своєї життєдіяльності.
- Другий тип - це анаеробні очисні системи, де процеси відбуваються у відсутності кисню. У таких системах мікроорганізми, наприклад, метаногенні бактерії, здійснюють розклад органічних речовин без використання кисню.

Важливим аспектом є те, що навіть при досягненні 90-95% технічної ефективності споруд біологічного очищення (біоставки, поля зрошування, поля фільтрації) не гарантується достатнє видалення органічних речовин зі стічних вод. Біологічно очищені стічні води можуть мати високу кольоровість (до 400°). Концентрація стічних вод зменшується при розведенні в 200 разів. Хімічне споживання кисню (ХСК) у біологічно очищених водах досягає 280-350 мг О₂/л. При відведенні таких стічних вод у поверхневі водойми, вода в них може мати неприємний запах на відстані до 20 км нижче місця випуску. Запах зникає лише при розведенні в 2-5 разів. Колоровість води у водоймах збільшується в 3-4 рази, різко знижується концентрація розчиненого у воді кисню. Збільшується вміст звислих частинок вдесятеро [101,107,108].

З технічного погляду існує кілька варіантів штучного біологічного очищення. На сьогоднішній день основними з них є активний мул, аеротенки, біофільтри і метанотенки [107,108].

У біофільтрах стічні води проходять через шар грубозернистого матеріалу, покритого тонкою бактерійною плівкою. Ця плівка сприяє інтенсивному протіканню процесів біологічного окиснення. Саме вона виконує активну роль у таких біофільтрах.

Аеротенки - це великі резервуари зі залізобетону. Вони містять активний мул з бактеріями та мікроскопічними організмами. Бактерії утворюють плівку і виділяють ферменти, які мінералізують органічні забруднення. Мул швидко осідає, відділяючись від очищеної води. Інші дрібні організми, такі як інфузорії, джгутикові, амеби, коловертки і т.д., пожирають бактерії, які не утворюють плівку, що сприяє омолодженню бактерійного мулу.

Анаеробні методи очищення відрізняються тим, що вони дозволяють отримати у якості концентрованих кінцевих продуктів метану та CO₂. При використанні таких методів не потрібна аерація, і утворюється незначна кількість надлишкового мулу. Особливістю аеробних методів очищення є забезпечення водних біоценозів киснем. Кисень використовується для окиснення забруднювачів, які містяться у воді шляхом отримання мінеральних сполук і біомаси.

При анаеробному розкладанні органічних речовин з утворенням метану лише 8% енергії витрачається на приріст біомаси, 3% складають теплові витрати, а 89% переходить у метан. Анаеробні мікроорганізми ростуть дуже повільно і потребують концентрованого субстрату.

При очищенні стоків з високою концентрацією забруднюючих речовин краще використовувати анаеробний метод очищення. Перевагою цього методу порівняно з аеробним є отримання біопалива. Крім того, анаеробний процес здійснюється при невеликих затратах електроенергії, без додавання додаткових поживних речовин у процесі ферментації, без особливого технологічного обслуговування та без запаху, оскільки реактор є закритим.

Інтенсивність процесу очищення стічних вод в певній установці визначається окиснювальною потужністю установки. Під окиснювальною потужністю розуміється кількість грамів кисню, який отримують з 1 м³ установки протягом доби та використовують для зниження біологічної потреби в кисні стічних вод, окиснення амонійних солей до нітритів і нітратів, а також для підвищення вмісту розчинного кисню в стічних водах. Окиснювальна потужність для різних установок може значно варіюватися. [107].

Дезінфекція стічних вод. Для остаточного знезараження стічних вод, які скидаються у природні водойми, використовують установки ультрафіолетового опромінювання. Для знезараження біологічно очищених стічних вод разом з ультрафіолетовим опроміненням також застосовують хімічну обробку, яка може включати в себе використання хлору або хлорного вапна протягом 30 хвилин. Хлорування також застосовується для видалення речовин, що мають неприємний запах. [107].

5.2.4 Заходи щодо поліпшення впливу виробництва ферментів на організм людини

З метою запобігання негативному впливу бактеріальних клітин на здоров'я людини, рекомендується дотримуватись наступних заходів безпеки:

1. Технологічні заходи: автоматизація та механізація процесів виробництва ферментів, використання дистанційного керування процесами та герметизація резервуарів. Ці заходи допомагають знизити ризик контакту з бактеріальними клітинами шляхом мінімізації прямого взаємодії людей з ними.

2. Санітарно-технічні заходи: використання місцевої витяжної вентиляції або переносних місцевих відсмоктувачів для обладнання робочих місць. Це допомагає видалити та зменшити концентрацію бактеріальних клітин у повітрі, що дихається працівниками.

3. Лікувально-профілактичні заходи: організація та проведення попередніх та періодичних медичних оглядів працівників, проведення дихальної гімнастики, використання лужних інгаляцій. Крім того, важливо забезпечувати працівників лікувально-профілактичним харчуванням та здоровими напоями, такими як молоко, для підтримання сильного імунітету.

Велика увага повинна бути приділена використанню засобів індивідуального захисту, особливо з метою захисту органів дихання. До таких засобів належать фільтруючі та ізолюючі протигази, респіратори, захисні окуляри та спеціальний одяг. [101,106,107,108].

Проблема запобігання негативного впливу біологічних факторів у виробничому середовищі на здоров'я людини та навколишнє природне середовище стає все важливішою з соціально-гігієнічних та медико-біологічних поглядів.

Під час виробництва ферментів великі обсяги води та повітря забруднюються мікроорганізмами-продуцентами, органічними та мінеральними речовинами. Склад стічних вод та відпрацьованого повітря є дуже складним.

У процесі виробництва ферментів робітники піддаються впливу різних виробничих факторів, таких як мікроклімат та біологічні агенти. Біологічні агенти включають складний органічний пил з живими клітинами або їх фрагментами.

Дослідження мікробіоти повітря має важливе значення з погляду санітарно-гігієнічних та фітопатологічних аспектів. Висока концентрація бактерій у повітрі виробничих приміщень під час виробництва ферментів негативно впливає на здоров'я працівників. Коли спори окремих мікроорганізмів потрапляють до легенів під час дихання, вони можуть осідати на слизових оболонках та призводити до їх зараження через заселення та виділення токсичних речовин. Серйозність захворювання та його клінічні

прояви залежать від кількості спор у повітрі, чутливості та імунного статусу організму.

Наукова література засвідчує, що вплив на здоров'я працівників у виробничому середовищі зумовлюється не лише спорами або клітинами бактерій, а також клітинними фрагментами, які часто не отримують достатньої уваги. Дослідження підтверджують, що дрібні частинки з розміром менше 2,5 мікрометра мають значний вплив на здоров'я людей. Було встановлено, що значна кількість імунологічно активних частинок мають розміри, які значно менші, ніж спори, що виділяються грибами забруднених поверхонь. Частинки розміром 0,3 мікрометра перевищують кількість спор в більш ніж 320 разів. Однак, виявлення таких малих клітинних фрагментів є складним завданням, оскільки традиційними методами дослідження біоаерозолів їх виявити неможливо.

Бактеріальні клітини можуть викликати алергічні захворювання. У людей зі значними імунодефіцитними станами може відбуватися пряма інфекція. Основними шляхами проникнення бактерій та їх спор в організм є шлунково-кишковий тракт та органи дихання.

6. ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА

Виробництво β -глюканази - це процес створення та масового виробництва ферментативного препарату, відомого як β -глюканаза. Бета-глюканаза є групою ферментів, здатних розщеплювати β -глюкани, складні полісахариди, які можна знайти у клітинних стінках різних організмів.

Економіка виробництва β -глюканази залежить від безлічі факторів, включаючи масштаб виробництва, технології, сировинних матеріалів, трудових витрат і ринкового попиту. Нижче наведено деякі загальні аспекти економіки виробництва β -глюканази:

1. Масштаб виробництва: Залежно від потреб ринку, виробництво β -глюканази може здійснюватися в різних масштабах - від невеликих лабораторних партій до великих промислових установок.

2. Технологія виробництва: Ефективність і вартість виробництва бета-глюканази залежить від використовуваної технології. Різні методи, такі як ферментаційне виробництво або генно-інженерні технології, можуть бути застосовані для отримання β -глюканази.

3. Сировинні матеріали: Для виробництва β -глюканази потрібна певна сировина, яка може варіюватися в залежності від використаного процесу. Це можуть бути мікроорганізми, рослинні або тваринні джерела.

4. Трудові витрати: Процес виробництва β -глюканази може потребувати праці кваліфікованих спеціалістів, включаючи біохіміків, мікробіологів і інженерів. Витрати на оплату праці можуть впливати на економіку виробництва.

5. Ринковий попит: Ринковий попит на β -глюканазу може впливати на економічну доцільність виробництва. Якщо попит високий, а конкуренція обмежена, це може сприяти більш високій рентабельності виробництва.

Метою економічної частини дипломного проекту є техніко-економічне обґрунтування виробництва «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» із гриба-мікроміцета *Trichoderma reesei*, для використання у фармацевтичній та харчовій галузях.

Для досягнення мети в роботі поставлені наступні завдання:

- провести аналіз ринку ферментів β -глюканази;
- розрахувати доцільність цього проекту з соціальної точки зору;
- розрахувати капітальні вкладення у проєкт;
- розрахувати собівартість виробленої продукції;
- розрахувати оподаткований прибуток та чистий прибуток;
- розрахувати термін окупності капітальних вкладень.

В цілому, успішне виробництво β -глюканази потребує аналізу всіх цих факторів і балансування витрат виробництва з очікуваною прибутковістю.

6.1 Маркетингове дослідження ринку

Ферменти застосовуються у різних галузях народного господарства України. Чільне місце серед них займають ферменти гідролази, серед них β -глюканаза.

Бета-глюканаза - фермент широкого застосування, який ефективно використовується в технологічних процесах різних галузей: виробництво спирту і пива, целюлозно-паперовій, текстильній промисловості Фермент використовується в пивоварінні, в процесі затирання, для забезпечення ефективності розщеплення β -глюканів, пентозанів та інших слизів, які є основною причиною поганого освітлення пива і надмірного завантаженню фільтраційного чану.

Статистичних даних у потребі ферментів β -глюканаз на підприємствах України у літературі не знайдено. Оскільки наш ферментний препарат планується для виробників пива, потребу у ньому розраховували виходячи з даних про об'єми пива, що виробляється в Україні.

Компанія Pro-Consulting здійснила аналіз ринку пива в Україні за 2021 рік [58].

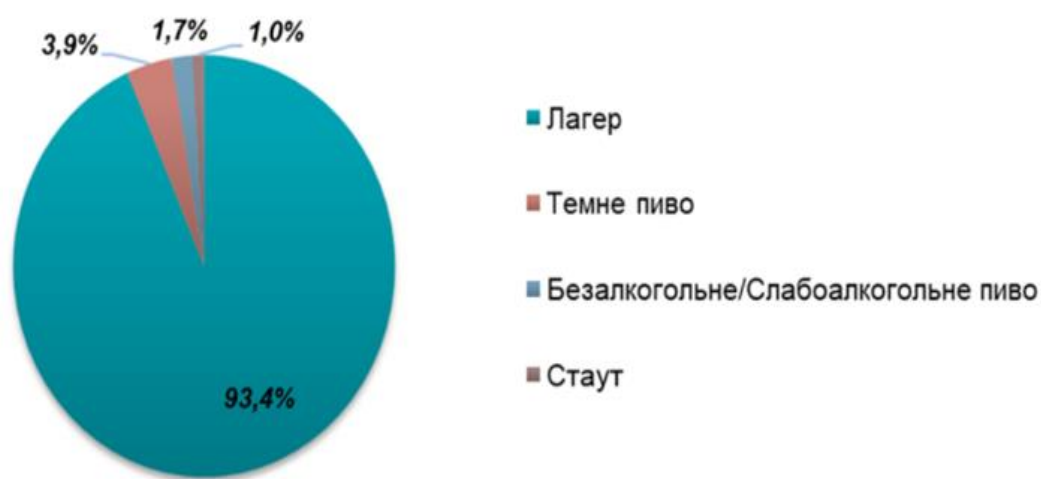


Рис. 6.1 Структура реалізації пива в Україні, 2021р. за джерелом [2].

В роботі зазначено, що пиво є лідером продажів у сегменті алкогольних напоїв із часткою 35 %. Близько 90 % пива в Україні – вітчизняного виробництва, адже імпортне пиво є дорожче, тому програє в конкуренції на ринку. За якісними показниками українське пиво не поступається закордонним зразкам. Через високу якість продукту, дизайну і різноманітність сортів і способів приготування попит на цей напій постійно зростає. На ринок пиво постачають в основному великі та середні підприємства. Кількість малих пивоварень, згідно проведених досліджень зменшується і зараз їх частка становить близько 6 % [58].

За повідомленням ПрАТ «Укрпиво», експертна оцінка обсягу виробництва пива в Україні (окрім пива безалкогольного з умістом спирту до

0,5 об. %) за 12 місяців 2022 року становила – 122,8 млн. дал, або 72,1 % до аналогічного періоду 2021 року [59].

Дані про застосування ферментних препаратів при виробництві пива сильно коливаються у залежності від рецептури виробників. Ця цифра може коливатися у ту чи іншу сторону. Але загальною тенденцією для України є те, що сучасні потреби промисловості у ферментних препаратах більш ніж на 90 % задовольняються за рахунок імпорту [106] .

6.2 Техніко економічне обґрунтування

У Стратегії розвитку високотехнологічних галузей до 2025 року та затвердження плану заходів щодо її реалізації схваленої Кабінетом міністрів (травень 2016 р.) одним із головних завдань є зменшення імпортозалежності вітчизняного високотехнологічного сектору. До цього сектору відносять і промислові біотехнології [106].

Пріоритетними напрямками промислових біотехнологій України у Стратегії окреслено окремі піднапрями, серед яких:

1. Виробництво ферментів, що дозволить відмовитись від використання імпортних ферментів та зменшити залежність промисловості України від іноземних постачальників;

2. Глибока переробка харчової сировини – на високоефективних промислових виробництвах за участю біотехнологічних процесів для забезпечення безвідходних виробництв [106].

У контексті вище наведених піднапрямів, виробництво ферментних препаратів, що зменшують імпортозалежність вітчизняних виробників пива, має надзвичайно важливе значення.

Розрахунок потреби у ферментному препараті наведено у розділі 2 даної роботи і вона складає- 47,06 тонн на рік.

Основним виробником ферментів в Україні є сьогодні Ладжинський завод «ENZIM». Завод «ENZIM» - це приватне підприємство. Бізнес. А мета будь - якого бізнесу – отримання прибутку. Слід зазначити, що мікробіологічні виробництва є досить рентабельним бізнесом. Наявність висококваліфікованих фахівців, здатних вирішувати теоретичні, технологічні, технічні та організаційні завдання в цій галузі, дозволяє підприємству працювати за складних економічних обставин у країні.

Серед 20 найменувань ферментних препаратів цього підприємства - 10 призначені до використання у харчовій промисловості. Серед них препарат «Беталад». Містить комплекс ферментів для затирання, зокрема енд-1,4- β - глюканазу. Застосовується на пивзаводах при затиранні, а також може додаватися в пиво для гідролізу залишкових, β -глюканів з метою усунення можливих проблем при фільтрації або під час зберігання пива.

Статистичних даних про виробництво даним підприємством цього ферменту у тоннах ми не знайшли. Але дане підприємство, станом на сьогодні випускає малоочищений препарат ГЗх у вигляді концентрату, призначений переважно для застосування у сільському господарстві, оскільки містить комплекс ферментів – а саме ксиланазу, целюлазу та β -глюканазу.

Отже, впровадження удосконаленої технології отримання, а саме виробництво високоочищеного препарату β -глюканази Г20х на основі *Trichoderma reesei* дозволить розширити асортимент продукції на ринку України та зменшити залежність промисловості України від іноземних постачальників.

6.3 Розрахунок економічної ефективності проєкту

6.3.1. Розрахунок інвестицій у проєкт

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

$$I = \text{ІБУД} + \text{ВУСТ} + T + M + H + \text{ВЗАЛ} + D - L + \Delta O A,$$

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);

H – 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;

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

L – 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.

Впровадження результатів дослідження плануються на Ладижинському заводі «ENZIM» (м.Ладижин, Вінницької обл.) На заводі є все необхідне обладнання та цехи, для випуску пропонованої нами продукції.

Впровадження проєкту не потребуватиме реконструкції будівлі та проведення будь-яких будівельних робіт. Необхідно здійснити демонтаж застарілого обладнання (установки для осадження ферменту спиртом).

Обслуговування оновленої технологічної лінії передбачатиме залучення одного додаткового працівника (оператора).

Оскільки планується виготовлення продукції підвищеної якості проєкт потребуватиме додаткових витрат на рекламу.

Тому ми обрали оптимальний варіант технічного переоснащення та деяке корегування технології. В таблиці 6.1 наведений перелік виробничого устаткування, яке необхідне для впровадження у виробництво з метою отримання високоочищеного препарату β -глюканаз

Таблиця 6.1 - Перелік впроваджуваного устаткування

Найменування устаткування	Кількість
Збірник продукту	1 шт
Ультрафільтраційна установка	1 шт

Ультрафільтраційна установка - 8750000 грн

Збірник – 460000 грн

Вартість обладнання складає:

$$\text{Вуст} = 8750 + 460 = 9210 \text{ тис.грн}$$

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

Інвестиції, які необхідні на придбання нової технологічної лінії з отримання «Висушеного ферментного препарату β -глюканази»:

Вуст = 9210 тис.грн.

$$\Delta OA = C_{\text{заг}} \cdot k,$$

де $C_{\text{заг}}$ – 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 %:

$\Delta OA = 32386,36 \cdot 0,15 = 4858$ тис, грн 15 % від повної собівартості всього обсягу

Розрахуємо капітальні вкладення у проєкт виробництва «Висушеного ферментного препарату β -глюканази»:

$$I = \text{Вуст} + P + (T + M + H + D) + \text{Взал} + \Delta OA$$

Табл 6.2 Розрахунок вартості придбаного виробничого устаткування

Устаткування	Кількість	Ціна	Вартість, тис. грн
1	2	3	4(2·3)
Ультрафільтраційна установка	1	8750000	8750
Збірник	1	460000	460
Разом			9210
Транспортні витрати (5%)			461
Витрати на монтаж (10%)			921

Витрати на демонтаж (5%)			461
Інші (заготівельно-складські) витрати (2%)			184,2
Всього			11237,2

Використовуючи дані з таблиці розраховуємо затрати;

$$(T+M+D+N) = 461+921+461+184 = 2026,2 \text{ тис.грн}$$

$$Взал = 0$$

Р-витрати на рекламу які дорівнюють 12000 в місяць, за рік =144 тис.грн

Загальна сума інвестицій дорівнює:

$$I = 9210 + 144 + (2026,2) + 0 + 4858 = 16238,2 \text{ тис. грн.}$$

6.3.2 Розрахунок виробничої програми

Обсяг виробництва (ОВріч), що планується складає 50 тонн, коефіцієнт використання обладнання, за даними заводу, складає 0,7

Виробнича потужність заводу складає:

$$ВП = ОВріч / Квп,$$

$$ВП = 50 / 0,7 = 71 \text{ тонна.}$$

6.3.3 Розрахунок чисельності працівників

Технологічна лінія з виробництва «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» працює три місяці на рік, не потребує великої кількості робітників. Щодо розстановки чисельності, плануємо чисельність основних робітників (Чроб) - 12. Робітники третього розряду переходять з іншої лінії

виробництва, так як вони є вільними в період виробництва сухого ферменту β -глюканази

6.3.4 Розрахунок собівартості виробництва ферменту β - глюканази з продуцента *Trichoderma reesei*

Вихід ферментного препарату з 1 м³ поживного середовища згідно наших розрахунків – 17,36 кг (розділ 4) , наповнювач – 21,2 тонни. Виходячи з цього розраховано потребу у поживних речовинах(сировині) на 50 тонн сухого ферментного препарату.

Витрати за статтею «Сировина і основні матеріали» наведено у таблиці 6.3

Назва	Норма затрат на 50 т, т, м ³	Ціна за одну тонну, тис. грн	Загальна вартість, тис. грн
Соеве борошно - 10,8 кг/м ³	31,1	90	2799
Вівсяне борошно - 5.4 кг/м ³	15,5	49	759,5
КН ₂ РО ₄ - 5,8 кг/м ³	16,7	116,4	190,4
(NH ₄) ₂ SO ₄ - 9,16 кг/м ³	26,3	52.8	152,5
CaCl ₂ - 0,76 кг/м ³	21	42	88,2
MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,76 кг/м ³	21	30	66,3
MgSO ₄ (ФАРМ) - 3.06 г/м ³	8,8	30	969,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O - 0,05 г/м ³	0,1	38,3	5,0
ZnSO ₄ - 2.6 г/м ³	7,5	52	389
CoCl ₂ - 3,76 г/м ³	10,8	715	7743

МКЦ – інд. -10,76 кг/м ³	31,1	180	5598
Лактоза (Prom) - 16.2 кг/м ³	46,7	79	3689
Твін 80 - 1.0 кг/м ³	2,8	480	1344
Старт. культура <i>Trichoderma reesei</i>	Дві ампули	1,0	2,0
CaSO ₄ (наповнювач)	5,3	70	371
NaCl (наповнювач)	19,9	5,5	109
Вода	2745	35,16	96,514
РАЗОМ			24372

Витрати на тару (споживчу) визначимо з урахуванням того, що вся продукція буде фасуватися в мішок поліпропіленовий «ДНІПРО – ПАК LTD» 40х55 на 10 кг, (Україна), по 2.50 грн за одиницю.

Витрати за статтею «Допоміжні матеріали» наведено у таблиці 3.4.2.

Таблиця 6.4 - Вартість «Допоміжні матеріали»

Найменування	Кількість на 50 т., шт	Ціна за од., грн.	Загальна вартість, грн
Мішок поліпропіленовий «ДНІПРО – ПАК LTD» 40х55 на 10 кг	5000	2,5	12500
Всього	-	-	12500

Витрати за статтею «Паливо і енергія на технологічні потреби» наведено у таблиці 6.5:

Таблиця 6.5 - Вартість «Паливо і енергія на технологічні потреби»

Найменування	Одиниця вимірювання	Кількість на випуск	Ціна, грн	Загальна вартість, грн
Електроенергія	кВт/год	1295	3,54	4584
Вода	м ³	2800	35,16	98448
Всього	-	-	-	103032

Розрахуємо заробітну плату основним виробничим робітникам.

Основна заробітна плата у місяць 1 робітника складає 10 тис. грн.

Всього основна заробітна плата:

$$ЗПос = 10 \cdot 12 \cdot 12 = 1440 \text{ тис. грн}$$

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

$$Вдзп = 1440 \cdot 0,2 = 288 \text{ тис.грн.}$$

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

$$Всз = (1440 + 288) \cdot 0,22 = 346 \text{ тис.грн.}$$

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

До витрат входять витрати утримання, амортизація, поточний ремонт обладнання та інструменту, утримання і ремонту обладнання, відшкодування зносу, інші затрати, котрі пов'язанні з утриманням та експлуатацією обладнання. За даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати: $1440 \cdot 1 = 1440 \text{ тис.грн.}$

Розрахуємо витрати за статтею «Загальновиробничі витрати», за даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати: $1440 \cdot 1 = 1440 \text{ тис.грн.}$

Виробнича собівартість складає суму перелічених витрат, яка дорівнює:
 $24372 + 12,5 + 103,032 + 1440 + 288 + 346 + 1440 + 1440 = 29442$ тис. грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Адміністративні витрати», які плануємо 5 % від виробничої собівартості: $29442 \cdot 0,05 = 1472,1$ тис. грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Витрати на збут», які плануємо 3 % від виробничої собівартості: $29442 \cdot 0,03 = 883,26$ тис. грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Інші операційні затрати», які плануємо 2 % від виробничої собівартості: $29442 \cdot 0,02 = 589$ тис. грн.

Повна собівартість на 50 т готового продукту.

Таблиця 6.6 - Повна собівартість 50 т «Висушеного ферментного препарату β -глюканази»

Статті витрат	Висушений ферментний препарат β -глюканаза тис. грн
1. Сировина і основні матеріали	24372
2. Допоміжні матеріали	12,5
3. Паливо і енергія на технологічні цілі	103,032
4. Основна заробітна платня виробничим працівникам	1440
5. Додаткова заробітна платня виробничим працівникам	288
6. Відчислення на соціальні потреби	346
7. Затрати на утримання і експлуатацію обладнання	1440
8. Загальновиробничі затрати	1440

Виробнича собівартість	29442
9. Адміністративні затрати	1472,1
10. Витрати на збут	883,26
11. Інші операційні витрати	589
Повна собівартість	32386,36

Розрахунок калькуляції собівартості 50 т «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» показав, що повна собівартість складає 32389,36 тис. грн., тобто собівартість 1 т = 647,73 тис. грн

За даними маркетингових досліджень було виявлено, що середня ціна складає в середньому на рівні 825 тис. грн. (за 1т).

Плануємо ціну «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» за 1т = 825 тис. грн.

$$825 \cdot 50 \text{ т} = 41250 \text{ тис. грн}$$

Розрахуємо собівартість «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» на весь обсяг.

Таблиця 6.7 - Розрахунок собівартості реалізованої продукції

Найменування продукції	Річний обсяг виробництва, т	Собівартість 1 т ,тис. грн	Собівартість виробленої продукції, тис. грн
1	2	3	4
«Висушеного ферментного препарату β -глюканази»	50	647,73	32386,36

Розрахуємо обсяг виробленої продукції, яку планується виробляти (таблиця 6.8):

Таблиця 6.8 - Розрахунок обсягу виробленої продукції

Найменування продукції	Обсяг продукції, т	Дійсна оптова ціна, тис. грн. за т	Обсяг виробленої продукції, тис. грн
1	2	3	4
«Висушеного ферментного препарату β -глюканази»	50	825	41250

6.3.5 Розрахунок прибутку та чистого прибутку

Розрахуємо прибуток від виробництва та реалізації продукції «Висушеного ферментного препарату β -глюканази».

Оподаткований прибуток від збільшення обсягу виробництва продукції визначимо за формулою:

$$\Pi = \text{ВП} - \text{С} , \quad (4)$$

де Π - прибуток за рік, тис. грн.,

ВП - обсяг виробленої продукції, тис. грн.,

С - собівартість виробленої продукції, тис. грн.

$$\Pi = 41250 - 32386,36 = 8863,64 \text{ тис. грн}$$

Розрахуємо чистий прибуток за формулою:

$$\text{ЧП} = \Pi - \Pi_{\text{п}} , \quad (5)$$

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

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

$$\text{ЧП} = 8863,64 \cdot 0,82 = 7268,18 \text{ тис. грн.}$$

6.3.6 Розрахунок терміну окупності інвестицій

Розрахуємо термін окупності капітальних вкладень.

Термін окупності капітальних вкладень визначаємо за формулою:

$$T = I / \text{ЧП}, \quad (6)$$

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

ЧП - чистий прибуток, тис. грн.

$$T = 16238,2 / 7268,18 = 2,23 \text{ років.}$$

З економічних розрахунків отримуємо термін окупності виробництва «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» – 2,23 років

Таблиця 6.9 Техніко-економічні показники проєкту виробництва “Висушеного ферментного препарату β -глюканази”

Найменування показників	Значення показників
1. Виробнича потужність, тонн	71
2. Обсяг виробленої продукції, тонн	50
3. Обсяг виробленої продукції, тис.грн.	41250
4. Собівартість виробленої продукції, тис.грн.	32386,36
5. Оподаткований прибуток, тис.грн.	8863,64
6. Чистий прибуток, тис.грн.	7268,18
7. Чисельність працюючих, люд.	12

8. Середньорічний виробіток одного працівника, тис. грн.	3375
9. Інвестиції, тис.грн.	16238,2
10. Строк окупності інвестицій, років	2,23

ВИСНОВОК ДО РОЗДІЛУ 6

В результаті установки технологічної лінії для виробництва «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» обсяг виробленої продукції цеху виробництва складе 50 т, що в грошовому вираженні складає 41250 тис. грн. Собівартість виробленої продукції складає 32386,36 тис. грн. Прибуток після установки обладнання складає 8863,64 тис. грн., з якого чистий прибуток складає 7268,18 тис. грн. інвестиції у проєкт необхідні у сумі 16238,2 тис. грн., строк окупності яких складе 2,2 роки, що є у межах нормативного терміну.

Всі розраховані показники дозволяють стверджувати, що виробництво лінії «Висушеного ферментного препарату β -глюканази» на комплексному біотехнологічному заводі є економічно вигідним.

ВИСНОВКИ

1. На основі розрахунків та статистичних даних обґрунтовано потребу у препараті- β - глюканазі. Потреба у такому препараті для виробників пива – близько 50 тонн на рік.
2. На основі скринінгу особливостей культивування найбільш поширених мікроорганізмів-продуцентів β -глюканазі обрано культуру продуцент ферменту - *Trichoderma reesei*
3. Запропоновано співвідношення основних субстратів - індукторів у поживному середовищі, соєвого борошна та вівсяного борошна - 2:1 - оптимальне для культивування *Trichoderma reesei*
4. Доведена економічна доцільність впровадження. Термін окупності запропонованих удосконалень технології отримання ферментного препарату β -глюканазі складає – 2,23 роки.
5. Запропоновано очищення ферменту за допомогою ультрафільтрації, що максимально зберігає активність ферментного препарат

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Ферменты для пивоварения [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/ru_RU/products/enzymes/brewing.html
2. Фермент Ультрафло L [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.sergeyosetrov.narod.ru/Projects/Water_and_heat_processing/Sacharification_station/Ultraflo_L.htm
3. Ферменты для пивной промышленности [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://homebeer.csutio.ru/articles-from-beer/fermentyi/>
4. Ферменты ENZIM [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ferment.enzim.biz>
5. Abuajah, C.I., Ogbonna, A.C. and Umoren, P.E. (2013). Current Developments on β -Glucans as Functional Components of Food: A Review. *Annals of Food Science and Technology*, 14(2): 217 – 229.].
6. Nicholas C. The Maize Mixed-Linkage (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -d-Glucan Polysaccharide Is Synthesized at the Golgi Membrane /C. Nicholas, C. Maureen, C. McCann// *Plant Physiol*, 2010. - Vol. 153(3). - p. 1362–1371.
7. Vizhi V.K. Study on Estimation, Extraction and Analysis of Barley Beta-glucan /V.K. Vizhi, J.N. Many// *International Journal of Science and Research*, 2012. - Vol. 358(3). - p. 1480-1484
8. Havrlentova, M., Petrulakova, Z., Burgarova, A., Gago, F., Hlinkova, A. and Sturdik, E. (2011). Cereal β -Glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods – A Review. *Czech Journal of Food Science*, 29(1): 1-14.
9. Cui, W., Wood, P. J., Blackwell, B., and Nikiforuk, J. (2000). Physicochemical Properties and Structural Characterization by Two-dimensional NMR Spectroscopy of Wheat β -D-Glucans – Comparison with Other Cereal β -D-Glucans. *Carbohydrate Polymers*, 41(3): 249–258.
10. Акимова О.В. Продуктивность и качество зерна голозерных и пленчатых сортов овса в условиях Западной Сибири /О.В. Акимова, Г.Я.

Козлова// Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2012. № 2(88). - С. 5-9.

11. Климова А. Е. Химический состав зерна овса при традиционной и экологической культуре: урожайность, масса зерна, содержание аминокислот, глюкозидов, витаминов, минеральных веществ, остатков пестицидов и др. (ФРГ) /А. Е. Климова// Экологическая безопасность в апк. Реферативный журнал, 2006. - № 3. С. 346 – 351.

12. Gajdosova A. The content of water-soluble and water-insoluble β -Dglucans in selected oats and barley varieties /A. Gajdosova, Z. Petrulakova, M. Havrlentova, V. CERVENA, B. Hozova, E. Sturdik, G. Kogan// Carbohydr Polym, 2007. - Vol. 70. - p. 46-52.

13. Buksa K. Isolation, modification and characterization of soluble arabinoxylan fractions from rye grain. /K. Buksa, R. Ziobro, A. Nowotna, W. Praznik, H. Gambuś// European Food Research and Technology. September, 2012. - Vol. 235 (3) - p. 385–395.

14. Guillon F. Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm wheat /F. Guillon, O. Tranquet, L. Quillien, J. P. Utille, J. J. Ordaz Ortiz, L. Saulnier// J Cereal Sci, 2004. – Vol. 40 – p. 167-182.

15. Gebler J., Gilkes N.R., Claeyssens M., Wilson D.B., Beguin P., Wakarchuk W.W., Kilburn D.G., Miller R.C., Warren R.A.J., Withers S.G. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases // Journal of Biological Chemistry. – 1992. – Vol. 267. N 18. – P. 12559–12561.

16. Henrissat B., Callebaut I., Fabrega S., Lehn P., Mornon J.P., Davies G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – Vol. 92. N 15. – P. 7090–7094

17. Stone BA, Clarke AE (1992) Chemistry and biology of 1,3-LGlucans: Bundoora. La Trobe University Press, Australia

18. Planas A (2000) Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochim Biophys Acta* 1543(2):361–382
19. Abraham A., Narayanan S.P., Philip S., Nair D.G., Chandrasekharan A., Kochupurackal J. In silico characterization of a novel beta-1,3-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* – a bacterial endophyte of *Hevea brasiliensis* antagonistic to *Phytophthora meadii* // *Journal of Molecular Modeling*. – 2013. – Vol. 19. N 3. – P. 999– 1007.
20. Fulop L, Ponyi T (2015) Classification of glycosyl hydrolases based on structural homology. *Journal of Universal Science* 2(1):1–9
21. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *En. Nucleic Acids Res* 37:D233–D238
22. Abe K, Nakajima M, Yamashita T, Matsunaga H, Kamisuki S, Nihira T, Takahashi Y, Sugimoto N, Miyanaga A et al (2017) Biochemical and structural analyses of a bacterial endo- β 1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family. *J Biol Chem* 292(18):7487–7506
23. Sathya TA, Khan M (2014) Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. *J Food Sci* 79(11):R2149–R2156
24. Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3(9): 853–859
25. Codera V, Gilbert HJ, Faijes M, Planas A (2015) Carbohydrate-binding module assisting glycosynthase-catalysed polymerizations. *Biochem J* 470(1):15–22
26. Martin K., McDougall B.M., McIlroy S., Chen J., Seviour R.J. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal beta-(1,3)- and beta-(1,6)-glucanases // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 31. N 2. – P. 168–192.
27. Fontaine T., Hartland R.P., Beauvais A., Diaquin M., Latge J.P. Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Aspergillus*

fumigatus // European Journal of Biochemistry. – 1997. – Vol. 243. N 1–2. – P. 315–321.

28. Blattel V., Larisika M., Pfeiffer P., Nowak C., Eich A., Eckelt J., Konig H. Beta-1,3-glucanase from *Delftia tsuruhatensis* strain MV01 and its potential application in vinification // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77. N 3. – P. 983–990.

29. Takeda T., Nakano Y., Takahashi M., Konno N., Sakamoto Y., Arashida R., Marukawa Y., Yoshida E., Ishikawa T., Suzuki K. Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Euglena gracilis* // Phytochemistry. – 2015. – Vol. 116. – P. 21–27.

30. Sakamoto Y., Nakade K., Konno N. Endo-beta-1,3-glucanase GLU1, from the fruiting body of *Lentinula edodes*, belongs to a new glycoside hydrolase family // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77. N 23. – P. 8350–8354.

31. Nogi Y., Horikoshi K. A thermostable alkaline β -1,3-glucanase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. AG-430 // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1990. – Vol. 32. N 6. – P. 704–707

32. Labourel A., Jam M., Jeudy A., Hehemann J.H., Czjzek M., Michel G. The beta-glucanase ZgLamA from *Zobellia galactanivorans* evolved a bent active site adapted for efficient degradation of algal laminarin // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289. N 4. – P. 2027–2042.

33. Бурцева Ю.В., Веригина Н.С., Сова В.В., Пивкин М.В., Звягинцева Т.Н. О-гликозилгидролазы морских мицелиальных грибов. β -1,3-Глюканазы *Trichoderma aureoviride* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Том. 39. Вып 5. – С. 542–548.

34. Pitson S.M., Seviour R.J., McDougall B.M., Woodward J.R., Stone B.A. Purification and characterization of three extracellular 1,3-beta-D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* // Biochemical Journal. – 1995. – Vol. 308 (Pt 3). – P. 733–741

35. Hartl L., Gastebois A., Aïmanianda V., Latgé J.-P. Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus* // *Fungal Genetics and Biology*. – 2011. – Vol. 48. N 2. – P. 185–191.
36. Genta F.A., Bragatto I., Terra W.R., Ferreira C. Purification, characterization and sequencing of the major beta-1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 39. N 12. – P. 861–874.
37. Kovalchuk S.N., Sundukova E.V., Kusaykin M.I., Guzev K.V., Anastiuk S.D., Likhatskaya G.N., Trifonov E.V., Nurminski E.A., Kozhemyako V.B., Zvyagintseva T.N., Rasskazov V.A. Purification, cDNA cloning and homology modeling of endo-1,3- beta-D-glucanase from scallop *Mizuhopecten yessoensis* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 143. N 4. – P. 473–485.
38. Liu W.C., Lin Y.S., Jeng W.Y., Chen J.H., Wang A.H., Shyur L.F. Engineering of dual-functional hybrid glucanases. // *Protein Engineering Design & Selection*. - 2012 - Vol. 11. - P. 771-780.
39. Gueguen Y., Voorhorst W.G., van der Oost J., de Vos W.M. Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3-glucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. N 50. – P. 31258–31264.
40. Trincone A. Angling for uniqueness in enzymatic preparation of glycosides. *Biomolecules*. 2013 Jun 13;3(2):334-50. doi: 10.3390/biom3020334. PMID: 24970171; PMCID: PMC4030847.
41. de Marco J.L., Felix C.R. Purification and characterization of a beta-glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2007. – Vol. 50. N 1. – P. 21–29.
42. Jose D., Jayesh P., Gopinath P., Mohandas A., Singh I.S.B. Potential application of beta-1,3-glucanase from an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 123 in fungal DNA extraction // *Indian Journal of Experimental Biology*. – 2014. – Vol. 52. N 1. – P. 89–96.

43. Musoni M., Destain J., Thonart P., Bahama J.B., Delvigne F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems // Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement. – 2015. – Vol. 19. N 4. – P. 430–442.
44. Yang, S.Q., Xiong, H., Yang, H.Y., Yan, Q.J. and Jiang, Z.Q. (2015), High-level production of β -1,3-1,4-glucanase by *Rhizomucor miehei* under solid-state fermentation and its potential application in the brewing industry. J Appl Microbiol, 118: 84-91. <https://doi.org/10.1111/jam.12694>
45. <https://www.researchgate.net/publication/>
46. Sharma, A., Satyanarayana, T., & Gupta, R. (2012). Production of β -glucanase using *Aspergillus niger*
47. Gupta, N., Rathi, P., & Gupta, R. (2015). Solid state fermentation technology: An overview. International Journal of Food Fermentation Technology, 5(2), 107-119.
48. Rai, S., Mukherjee, A. K., & Mukhopadhyay, S. (2012). Solid state fermentation of *Aspergillus awamori* for the production of β -glucanase. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 10(1), 69-76.
49. Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., & Singh, D. (2000). Solid-state fermentation in biotechnology. Current Science, 77(1).
50. Sheng, J., Maruyama, J., Kitajima, Y., Nishikawa, A., & Sugahara, Y. (2017). Production of beta-glucanase using recombinant yeast cells with high cell densities and high cell viability. Journal of Bioscience and Bioengineering, 123(3), 343-348.
51. Liu, M., Wang, G., Wang, Q., & Zhang, B. (2019). Development of a high-yield β -glucanase producing strain by genetic engineering. Microbial cell factories, 18(1), 31.
52. Li, Y., Liang, Y., Ji, X., Jin, Z., Zhang, H., & Jiang, Z. (2019). Efficient expression of β -glucanase gene in *Bacillus amyloliquefaciens* and characterization

of the recombinant enzyme. International Journal of Biological Macromolecules, 130, 168-175.

53. Chen, X., Li, Y., Li, Y., & Ma, Y. (2020). Efficient production of β -glucanase using recombinant *Bacillus subtilis* and its application in beer production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 47(5), 425-435.

54. Wu, X., Liu, L., Zhang, Y., Jiang, M., Li, J., & Wang, F. (2020). Overexpression of β -glucanase gene in *Bacillus subtilis* for efficient production of a bioactive peptide from soy protein isolate. Journal of Food Biochemistry, 44(3), e13111.

55. https://www.researchgate.net/publication/343926974_Optimization_of_Process_Variables_for_Production_of_BetaGlucanase_by_Aspergillus_niger_CC_UG33991_in_Solid-State_Fermentation_Using_Wheat_Bran

56. Hong MR, Kim YS, Joo AR, Lee JK, Kim YS, Oh DK. Purification and characterization of a thermostable beta-1,3-1,4-glucanase from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. J Microbiol Biotechnol. 2009 Aug;19(8):818-22. PMID: 19734720.

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

58. Дослідження ринку пива в Україні. 2022 рік. Pro-Consulting: [Веб-сайт]. м. Київ, 2022. URL: <https://pro-consulting.ua/ua/issledovanie-rynka/analiz-rynka-piva-v-ukraine-2022-god>.

59. Українська галузева компанія по виробництву пива, безалкогольних напоїв та мінеральних вод УКРПІВО : [Веб-сайт]. Київ, 2022. URL: <http://ukrpivo.com/obsyag-virobnitstva-za-6-misyatsiv-2022/> (дата звернення: 12.03.2023).

60. Зиганшин Д.Д., Сироткин А.С. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба // Вестник Казанского технологического университета. 2017. №10. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-glubinnogo-i-poverhnostnogo-kultivirovaniya-gribov-trichoderma-dlya-polucheniya-biopreparatov-na-osnove-kletok-griba> .

61. Михайлова, Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии / Р. В. Михайлова. – Минск : Белорусская наука, 2007. – 408 с. – Режим доступа: по подписке. – URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=86741> – ISBN 978-985-08-0853-0. – Текст : электронный.

62. Леонтьев Д. В., Акулов О. Ю. Загальна мікологія: Підручник для вищих навчальних закладів. — Х.: Вид. група «Основа», 2007. — 228 с.: 375 іл.

63. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф.К.Алимова. – Казань: Казанский государственный университет им.В.И.Ульянова-Ленина, 2006. – 209 с.

64. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов 3-е изд., перераб и доп. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.

65. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии: обзор. Часть I. Поиск микроорганизмов продуцентов ферментов // Вопросы биологической, медицинской, фармацевтической химии. – 2016. - №4. – С.23-32.]

66. Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C., Pegler D.N. (eds.) Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi, 8th edn. – Wallingford: CAB International, 1995.

67. Дьяков Ю.Т. II Биология // Соровский образовательный журнал. – 1997. – № 3. – С. 38–45

68. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chand I., Lorito M. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – V. 2, No 1. – P. 43–56.
69. Franco P.F., Ferreira H.M., Filho E.X. Production and characterization of hemicellulase activities from Trichoderma harzianum Strain T4 // Biotechnol Appl Biochem. – 2004. – V. 6. – P. 32–40
70. Xiong H., von Weymarn N., Turunen O., Leisola M., Pastinen O. Xylanase production by Trichoderma reesei Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates — 2005. – Bioresource Technology. – P. 96
71. Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Соснина Н.А., Миронов В.Ф. Культивирование гриба Trichoderma на растительном сырье // Химия и компьютерное моделирование. – 2002. – № 7. – С. 57–60.
72. Abd El-Rahim W.M., Moawad H., Khalafallah M. Microflora involved in textile dye waste removal // J. Basic Microbiol. – 2003. – V. 43, No 3. – P. 167–174.
73. Georgakopoulos D.G., Fiddaman P., Leifert C., Malathrakis N.E. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by Pythium ultimum with bacterial and fungal antagonists // J. Appl Microbiol. – 2002. – V. 92, No 6. – P. 1078–1086.
74. Alimova F.K., Zakharova N.G., Mako Ghulam Asghar, Fattakhova A.N., Garusov A.V. The study the quarantine control and the methods of disinfection of tomato and cucumber seeds in different regions of Russian Federation // Pakistan J. of scientific and industrial research. – 2002. – P. 38–45.
75. Gaber Z., Heba A. Bio-active composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorous nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea // Bioresource Technology. – 2005. – № 96. – P. 929–935
76. Kredics L., Antal Z., Doczi I., Manczinger L., Kevei F., Nagy E. Clinical importance of the genus Trichoderma // A review Acta Microbiol Immunol Hung. – 2003. – V. 50, No 2–3. – P. 105–117.

77. Билай В. И. Основы общей микологии: Учеб. пособие для вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. – 360 с
78. Nur A. Zin. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications / Nur A. Zin, Noor A. Badaluddin // *Annals of Agricultural Sciences* / Nur A. Zin, Noor A. Badaluddin. – Terengganu, Malaysia: Elsevier, 2020. – С. 168–178.
79. Практикум по микробиологии: пособие для вузов / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева; под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.: ил.
80. André Schuster. Biology and biotechnology of *Trichoderma* / André Schuster, Monika Schmoll // *Applied Microbiology and Biotechnology* / André Schuster, Monika Schmoll. – Vienna, 2010. – (Springer). – С. 767–799.
81. Дудка І. О. Методи експериментальної мікології. Справочник / Дудка І. О., Вассер С. П., Елланська І. А., та ін.. – Київ: Наукова думка, 1982. – 550 с. – (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного).
82. Serrano V. Cellulase production by *Trichoderma reesei* // *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1983. - Vol. 18.-pp. 29-37..
83. Danielson R. M. and Davey C. B. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* // *Soil Biol. Biochem.* – 1973. - Vol. 5, pp. 505-515
84. Mehta J., and etc. Impact of Carbon & Nitrogen Sources on the *Trichoderma viride* (Biofungicide) and *Beauveria bassiana* (entomopathogenic fungi) // *European Journal of Experimental Biology.* - 2012. - Vol.2 (6). – pp.2061-2067
85. Danielson R. M. and Davey C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture // *Soil Biology and Biochemistry.* -1973. – Vol. 5(5). – pp. 495-504]

86. Singh A. and etc. Optimal Physical Parameters for Growth of Trichoderma Species at Varying pH, Temperature and Agitation // Virology and Mycology. Volume 3, 2014

87. Влияние различных источников углерода на конидиеобразование микромицета *Trichoderma asperellum* OPF-19 в условиях глубинного культивирования. / Зиганшин Д.Д., и др. // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 20-22 февраля 2017 г. (2017), 2, 115-117.]

88. Krystofová S., Varecka L. and Betina V. The $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake by *Trichoderma viride* Mycelium. Correlation with Growth and Conidiation // Gen. Physiol. Biophys. – 1995. – Vol.14. – pp.323-337.]

89. Haapala R. Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei* / R. Haapala, E. Parkkinen, P. Suominen, S. Linko // Enzyme and Microbial Technology. – 1996. – Vol. 18. – P.495-501

90. Biely P. Enzymology of hemicellulose degradation / P. Biely, M. Tenkanen // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 25-47

91. <https://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/30727>

92. Лоскутов И. Овес-прошлое, настоящее и будущее. / Хлебопродукты, №5, 2007г, С.50-53

93. Польшалина Г.В. Определение активности ферментов [Справочник] / Г.В. Польшалина, В.С.Чередниченко, Л.В.Римарева – М.: Делипринт, 2003. – 375

94. ДСП-201-97. "Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць" (від забруднення хімічними та біологічними речовинами).

95. СанПиН 42-128-49-690 "Санитарные правила содержания территорий населенных мест".

96. СанПіН 4630 "Санітарні правила та норми охорони поверхневих вод від забруднення".

97. Основи охорони праці / [Ткачук К. Н., Халімовський М. О., Запарний В. В. та ін.]; під ред. Ткачука К.Н. та Халімовського М.О. - [2-ге вид., допов. та перероб.] - К.: Основа, 2006. - 448 с.

98. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю: ДСП 9.9.5.-080-2002. - Офіц. вид. - К. : ГРІФРЕ: М-во охорони здоров'я України, 2002. - 33 с.

99. ГОСТ 12.40.11-75 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Классификация.

100. ГОСТ 12.1.005-76 Система стандартов безопасности труда. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования.

101. ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

102. ГОСТ 12.1.008-76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования.

103. ГОСТ 17.1.1.01-77 Охрана природы. Гидросфера. Использование и охрана вод. Основные термины и определения.

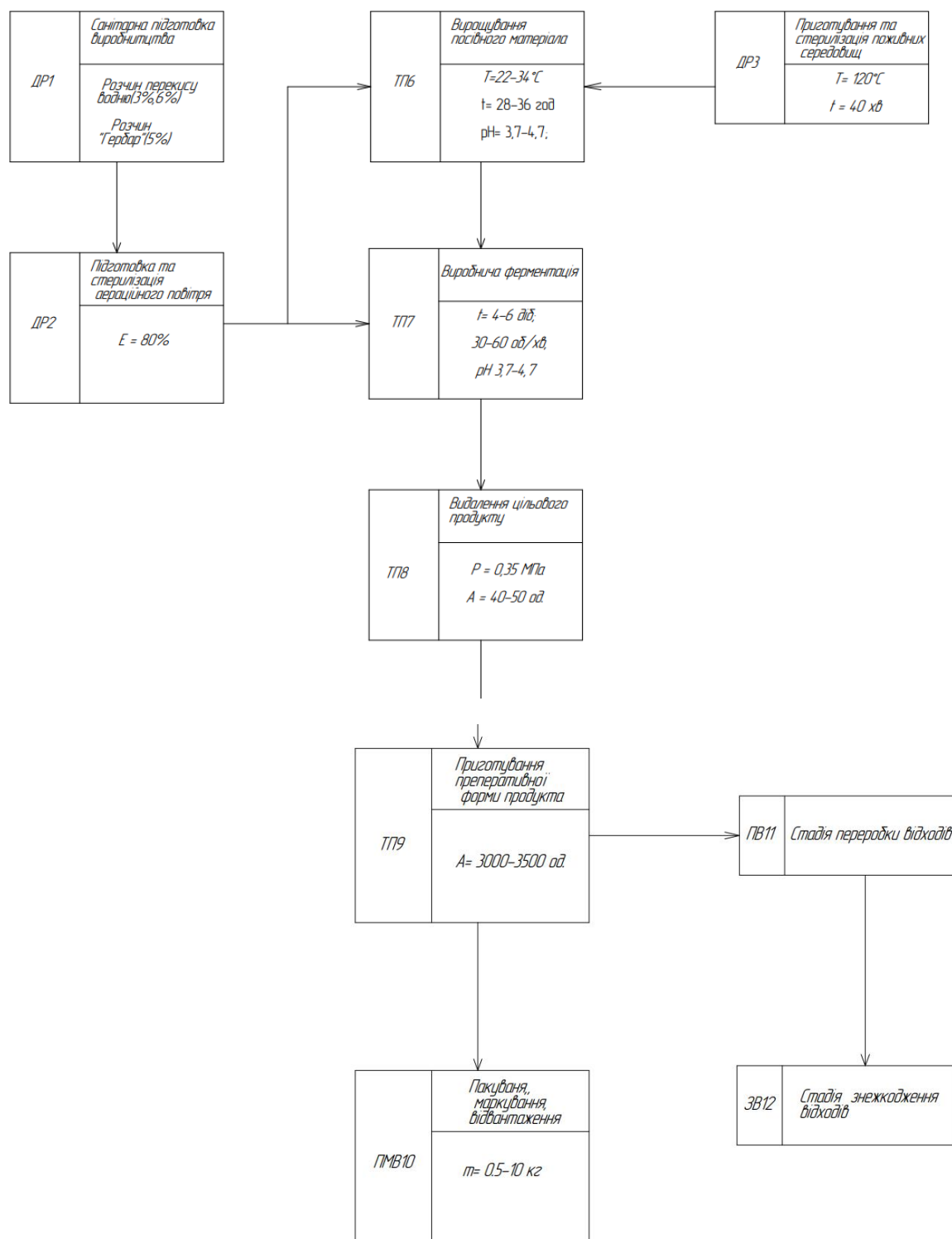
104. ГОСТ 17.2.3.02-78 Охрана природы. Атмосфера. Правила установления допустимых выбросов вредных веществ промышленными предприятиями.

105. Швед О.В .Екологічна біотехнологія: навч. Посібник: у 2кн./О.В.Швед, Р.О.Петріна, О.З. Комаровська – Порохнявець, В П Новіков. – Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2018. 368 с.

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

ДОДАТОК 1

Постадійна технологічна схема отримання ферментного препарату β -глюканаз



ДОДАТОК 2

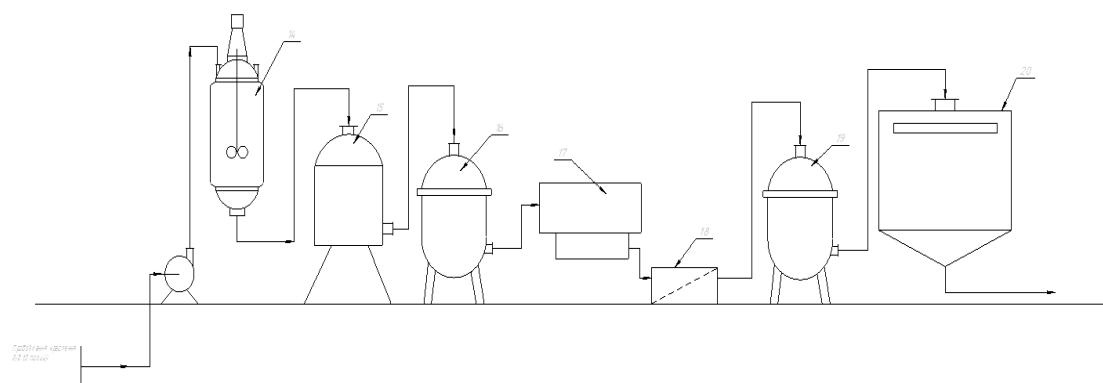
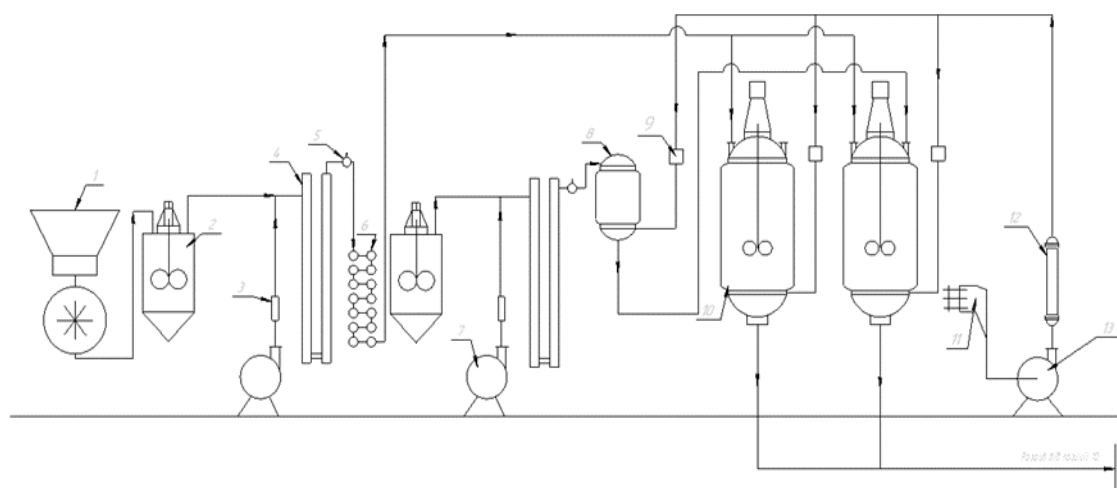
Специфікація обладнання

Позиція	Позначення	Найменування	Кількість	Примітка
1	2	3	4	5
1	ДМ8	молоткова дробарка	2	Продуктивність - 900-2000кг / год (залежно від типу і вологості сировини, що завантажується)
2	СВВ- 1,25М	змішувач поживного середовища	2	від компанії UkrYuzhMolprom PKF, ООО.
3	ГПД-640	стерилізатор повітряний	2	оснащений високим рівнем автоматики
4	JRV-SF16	редукційний клапан з пілотним керуванням Jokwang	2	Вихідний тиск налаштовується в діапазоні від 0,35 до 8 бар. Максимальна робоча температура - +220°C.
5	PTA(GL)-8	теплообмінник	2	розбірна конструкція з можливістю зміни площі теплообміну
6	HF 30B	відцентровий насос	2	Pedrollo (120 м³/год)
7	ВЄЄ2.3.-0,6К	інокулятор	2	виконані з нержавіючої сталі 12Х18Н10Т і фторопласта Ф-4
8	Н12	повітряний фільтр	4	затримуючи мікрочастинки розміром до 0,3 мкм
9	ВЄЄ2.3.-0,6К	ферментер	2	виготовляються зі сталі марки Х18Н10Т з паровою сорочкою під тиском не більше 3 кг/см²
1	2	3	4	5

10	SC401MG0,85T	повітродувка	2	ступінь захисту - IP54, нагрівостійкість ізоляції клас F.
11	КС-26	збірник культур	2	фільтрування під надлишковим тиском не більше 0,5 МПа
12	ОГШ-501	сепаратор	2	ОГШ - осаджувальна; У - вуглецева; К - нержавіюча.
13	ФПМм 100—1000/45K	Рамний фільтр	2	максимальний тиск стиснення: 10 бар.
14	UF-30	Ультрафільтраційна установка	2	продуктивністю 30 м³/год
15	B-90 HP	Розпилювальна сушарка	2	Контрольоване і безпечне отримання дрібних частинок (0,2 - 5 мкм)

ДОДАТОК 3

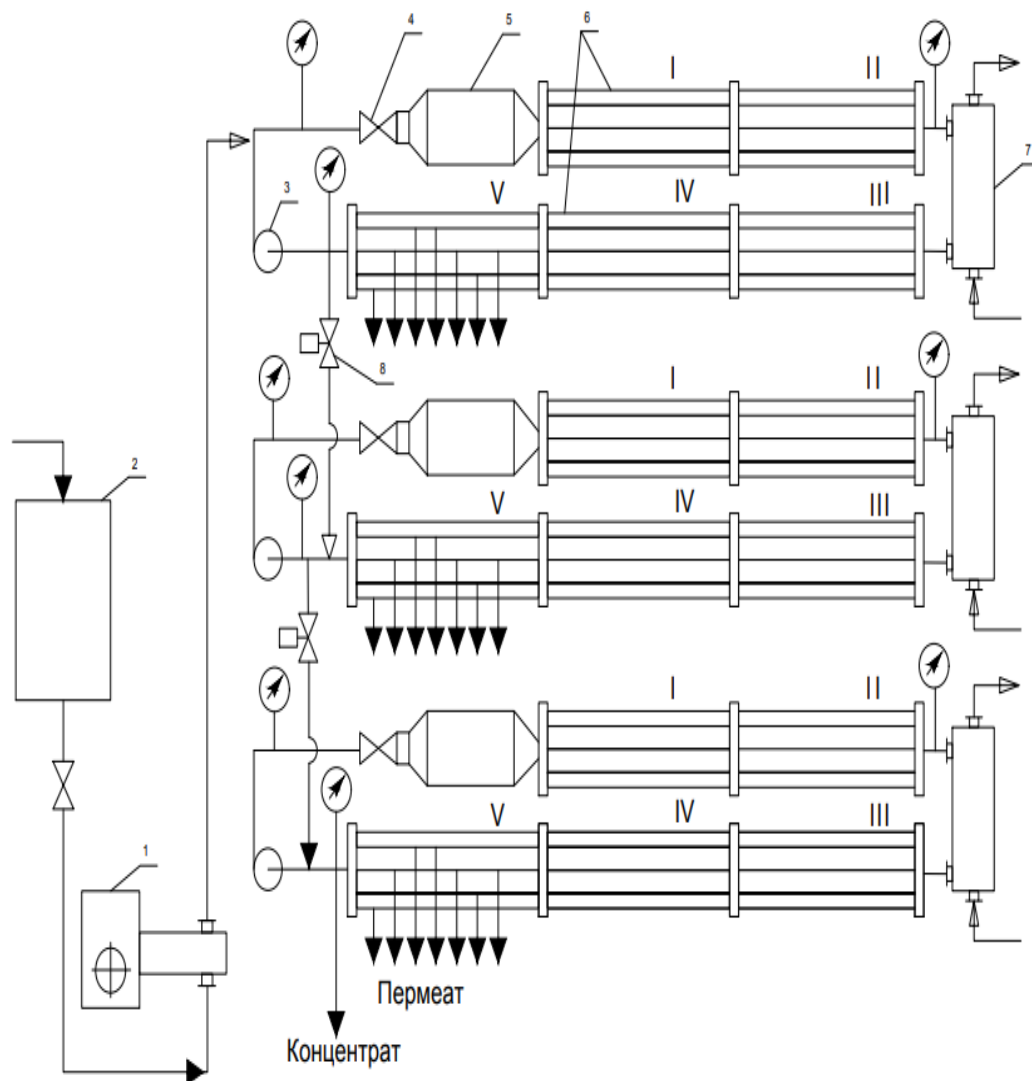
Апаратурна схема удосконаленої технології отримання ферментного препарату β – глюканаз



Позиція	Позначення	Найменування	
1	ДМ8	Молоткова дробарка	2
2	СВВ - 1,25	Змішувач поживного середовища	2
3	ГПД-640	Стерилізатор	2
4	ТНП -061	Витримувач	2
5	JRV-SF16	Редукційний клапан	2
6	PTA (GL)-8	Теплообмінник	2
7	HF 30B	Відцентровий насос	2
8	ВСС2.3.-06.К	Інокулятор	2
9	Н 12	Індивідуальний повітряний фільтр	2
10	ВСС2.3.-06.К	Ферментер	2
11	Н 12	Повітряний фільтр	2
12	-//-	Загальний повітряний фільтр	2
13	SC401MG0.85T	Повітрорудка	2
14	КС-26	Збірник культур	2
15	ОГШ-501	Сепаратор	2
16	КС-26	Збірник	2
17	ФПМм 100-1000/45К	Рамний фільтр	2
18	UF-30	Ультрафільтраційна установка	2
19	КС-26	Збірник	2
20	В-90 НР	Розпилювальна сушарка	2

ДОДАТОК 4

Схема ультрафільтраційної установки



ДОДАТОК 5

Розріз сепаратора

Позиція	Найменування
1	Станина
2	Вал
3	Верхня опора
4	Барабан
5	Шламовий простір
6	Тарілкоутримувач
7	Пакет тарілок
8	Кришка
9	Збірник легкої фракції
10	Збірник важкої фракції
11	Збірник шламу
12	Гальмо
13	Шестерня привода
14	Опора нижня

