

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

**Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю**

**Кафедра біотехнології і мікробіології**

**«До захисту в ЕК»**

**«До захисту допущено»**

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

Наталія ГРЕГІРЧАК

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«  » лютого 2022 р.

«  » лютого 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Продукти мікробного синтезу для руйнування біоплівок»

Виконав: здобувач II курсу, групи 2

ЩЕРБИНА Іван Сергійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Вікторія ЛОБАЦУК

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2022 р

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»  
(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЩЕРБИНИ Івана Сергійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Продукти мікробного синтезу для руйнування біоплівок»

керівник роботи СТАБНІКОВ Віктор Петрович Д.Т.Н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 863-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи продуценти антибіоплівкових речовин мікробного походження

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Літературний огляд

Обґрунтування біологічного агента

Техніко-економічне обґрунтування

Параметри культивування біологічного агента

Способи виділення цільового продукту

Точки контролю

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема (2 листи формату А1)

Технологічна схема (1 лист формату А2)

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Літературний огляд	03.11.2021 - 10.11.2021	
2	Опис цільового продукту	10.11.2021 - 20.11.2021	
3	Обґрунтування виробу біологічного агенту	20.11.2021 - 25.11.2021	
4	Техніко-економічне обґрунтування	25.11.2021 - 30.11.2021	
5	Біосинтез цільового продукту	30.11.2021 - 10.12.2021	
6	Виробничий біосинтез	10.12.2021 - 15.12.2021	
7	Апаратурна схема	15.12.2021 - 20.12.2021	
8	Технологічна схема	20.12.2021 - 25.12.2021	
9	Специфікація	25.12.2021 - 15.01.2022	
10	Опис технологічної схеми	15.01.2022 - 20.01.2022	
11	Контроль виробництва	20.01.2022 - 23.01.2022	
12	Список літератури. Вступ. Зміст. Реферат	23.01.2022 - 25.01.2022	
13	Оформлення роботи	25.01.2022 - 01.02.2022	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Іван ЩЕРБИНА**

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

**Віктор СТАБНІКОВ**

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена виробництву рамноліпідів з використанням штаму *P. aeruginosa* W10, який синтезує на МСМ доповненим гліцерином 9,7 г/л цільового продукту для боротьби з біоплівками на поверхнях медичного устаткування, розрахована річна потужність виробництва, яка становить 8,16 кг рамноліпідів за рік.

Виробництво рамноліпідів передбачає ряд допоміжних робіт, які включають в себе підготовку аераційного повітря, приготування та стерилізацію поживних середовищ. До технологічного процесу виробництва відносяться підготовка посівного матеріалу, виробництво культивування та стадії виділення. Технологію біосинтезу та виділення рамноліпідів продемонстровано в технологічній та апаратурній схемах даної роботи.

Кваліфікаційна робота включає в себе 100 сторінок друкованого тексту, включаючи 12 таблиць та 5 малюнків, складається з вступу, п'яти розділів, списку використаної літератури (102 джерела) та графічної частини (2 листа формату А1 та 1 лист формату А2).

**Ключові слова:** антибіоплівкові речовини, ПАР, рамноліпіди, *P. aeruginosa* W10.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РЕФЕРАТ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Щербина І.С.</i>					3	100
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	6
<b>ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД</b>	
РОЗДІЛ 1. Механізм утворення біоплівки, стратегії боротьби та антибіоплівкові речовини. ....	8
1.1 Механізм утворення біоплівки та стратегії боротьби.....	9
1.2 Антибіоплівкові речовини.....	11
РОЗДІЛ 2 . Продукти мікробного синтезу як агенти для руйнування біоплівки .....	13
2.1 Мікробні антибіотики, як агенти для руйнування біоплівки.....	13
2.2 Мікробні полісахариди, як агенти для руйнування біоплівки .....	17
2.3 Мікробні ферменти, як агенти для руйнування біоплівки.....	24
2.4 Мікробні ПАР, як агенти для руйнування біоплівки .....	30
<b>ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА</b>	
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ. ....	35
3.1 Передумови виробництва ЛЗ.....	35
3.1.1 Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання. ....	35
3.1.2 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку .....	37
3.1.3 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції. ....	37
3.1.4 Потреба у цільовому продукті.....	38
3.2 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів. ....	39
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	

<b>БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ.</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СПОСОБУ КУЛЬТИВУВАННЯ І ТИПУ ФЕРМЕНТЕРА</b> .....	<b>50</b>
<b>4.3 ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ</b> .....	<b>52</b>
<b>4.4.Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу (упаковки)</b> .....	<b>61</b>
<b>РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ</b> .....	<b>63</b>
<b>5.1. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> .....	<b>63</b>
<b>РОЗДІЛ 5.2 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	<b>67</b>
<b>РОЗДІЛ 5.3. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b> .....	<b>78</b>
<b>5.3.1. Мікробіологічний контроль</b> .....	<b>78</b>
<b>5.3.2. Мікроскопіювання</b> .....	<b>79</b>
<b>5.3.3. Визначення концентрації біомаси.</b> .....	<b>80</b>
<b>5.3.4. Визначення концентрації джерела вуглецю(гліцерину)</b> .....	<b>80</b>
<b>5.3.5. Визначення концентрації цільового продукту(рамноліпідів)</b> ....	<b>81</b>
<b>5.3.6. Визначення вологості</b> .....	<b>82</b>
<b>5.3.7. Ідентифікація активної діючої речовини</b> .....	<b>83</b>
<b>5.3.8. Антибіоплівкова активність (ступінь деструкції біоплівки).</b> ...	<b>83</b>
<b>5.3.9 Карта контролю</b> .....	<b>85</b>
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	<b>92</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>93</b>

## ВСТУП

Біоплівки – складні мікробні структури, які прикріплюються до поверхні і створюють матрицю, що складається з гідратованих позаклітинних полімерних речовин мікробного походження

На даний час для боротьби з біоплівками виділяють такі препарати як: антибіотики, ферменти, ПАР, екзополісахариди досліджується їх структура, особливості, механізм дії та найголовніше відповідні мінімальні інгібуючі концентрації (MIC), половина максимальної інгібуючої концентрації (IC) та інші показники активності.

Вже існуючі підходи спрямовані на пригнічення утворення біоплівок або на збільшення їх дисперсії. Розглядається можливість використання бактеріофагів для обробки біоплівок, а також використання ферментів, що руйнують полімери позаклітинного матриксу, для розчинення біоплівок. Ці нові підходи мають великий потенціал для руйнування бактеріальних біоплівок

За останній значно збільшилась потреба в застосуванні ендоскопічного обладнання, як для діагностики, так і для лікування, Під час ендоскопічної процедури ендоскоп контактує зі слизовими оболонками пацієнта, тому при наступній неправильній обробці ендоскоп може стати фактором передачі патогенних мікроорганізмів.

Із переліку активно-діючих речовин, які мають протимікробні властивості, не так багато таких, що підходять для з ефективного та безпечного знезараження ендоскопічного обладнання

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Щербина І.С.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					6	100
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Тому Актуальністю даної роботи є пошук та застосування альтернативних антимікробних речовин мікробного походження, які б характеризувались ефективністю дії та відсутністю резистентності до них патогенних мікроорганізмів. Одними з таких можуть бути мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР). А оскільки антибіотики викликають резистентність, а антимікробні засоби на основі ферментних препаратів потребують більшої концентрації діючої речовини ніж засоби на основі ПАР, найбільш альтернативними будуть саме такі антибіоплівкові засоби.

## **РОЗДІЛ 1. Механізм утворення біоплівки, стратегії боротьби та анібіоплівкові речовини.**

Нині актуальним залишається пошук безпечних та ефективних сполук, які б перешкождали адгезії мікроорганізмів до поверхонь або ж руйнували вже існуючої біоплівки на різноманітних поверхнях. Серед усіх інфекційних захворювань близько 65—80% спричиняються бактеріями, які формують біоплівки на поверхні медичного імплантованого обладнання (лінзи, катетери, протези, штучні серцеві клапани) або харчової промисловості. Сучасні технології руйнування мікробних біоплівок передбачають використання механічних, фізичних, хімічних і біологічних методів. В останні роки перевага надається біологічним методам завдяки їх високій ефективності, пролонгованій дії, безпечності для людини і навколишнього середовища. Проблема руйнування біоплівки є наразі досить актуальною, це підтверджує велика кількість новітніх статей з описом стратегії боротьби з бактеріальними біоплівками, де поставлений акцент на засобах проти біоплівок та на механізм дії цих засобів. Наприклад, в статті [1] було висвітлено механізм утворення біоплівок з посиланням на різні моделі і різні методи, використовувані для виявлення біоплівок. Основна увага була приділена різним молекулам проти біоплівок, виявленим або випробуваним до теперішнього часу, які можуть включати пептидні антибіотики, ЕПС, лантабіотики, ПАРи, ферменти та синтетичні хімічні сполуки, а також їх структури, механізм дії та їх відповідні МІС, МВС, мінімальна інгібуюча концентрація біоплівки (МВІС), а також половина максимальної інгібуючої концентрації (ІС). Також в статтях [2,3,4] обговорюються стратегії контролю біоплівок, включаючи пригнічення прикріплення мікробів, втручання в розвиток і диференціацію структури біоплівки, знищення клітин біоплівки і індукцію диспергування біоплівок.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Щербина І.С.</i>			<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				8	100
<i>Реценз.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					

*РОЗДІЛ 1*

В таких статтях, як [5,6,7] Також в статті [8] було зосереджено увагу саме на новітніх стратегіях розробки методів лікування, націлених на режим зростання біоплівки і які можуть бути використані для лікування інфекцій біоплівки. Підходи спрямовані на зменшення або придушення утворення біоплівок або на збільшення дисперсії біоплівок. Багато антибіотиків не є бактерицидними, але частково диспергують біоплівки. Розглядається можливість використання бактеріофагів для обробки біоплівок, а також використання ферментів, що руйнують полімери позаклітинного матриксу, для розчинення біоплівок. Ці нові підходи мають великий потенціал для руйнування бактеріальних біоплівок.

### ***1.1 Механізм утворення біоплівок та стратегії боротьби.***

Утворення біоплівок - це складний комплексний динамічний процес, що складається з декількох етапів: адгезії клітин на поверхні і перерозподілу клітинної маси; активного ділення клітин для створення клітинних кластерів; утворення екзополімерного слизового матриксу. Початкове прикріплення мікробної клітини до поверхні субстрату здійснюється за рахунок дії електростатичних, гідрофобних сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифічної адгезії. Адгезія до біологічних поверхонь обумовлюється специфічною взаємодією білків-адгезинів або лектинів фімбрій екзоплазматичного компартмента бактеріальної клітини з рецепторами або певними доменами поверхні мембран клітин-мішеней. Механізм адгезії грампозитивних бактерій відрізняється від механізму адгезії грамнегативних. Так, наприклад, найважливішим елементом в процесі адгезії стафілококів є полісахарид (Polysaccharide Intercellular Adhesin - PIA), який бере участь як в клітинній субстратній адгезії, так і в подальшому формуванні клітинних кластерів. У грамнегативних мікроорганізмів важливу роль в адгезії і клітинній агрегації грають джгутики і фімбрії IV типу. Рух, обумовлений джгутиками, сприяє поширенню і утворенню клітинного моношару на субстраті, а фімбрії IV

типу беруть участь в клітинній агрегації за рахунок лектинової взаємодії [7]. У міру розмноження бактерій вони більш міцно прилипають до поверхні, диференціюються, обмінюються генами, що забезпечує їх виживання.

Процес формування біоплівки можна розділити на три етапи.

1. Оборотно прикріплення до поверхні. Найчастіше мікроорганізми існують у вигляді вільно плаваючих мас або одиничних (наприклад, планктонних) колоній. Однак в нормальних умовах більшість мікроорганізмів прагне прикріпитися до поверхні і, в кінцевому рахунку, утворити біоплівку.

2. Перманентне прилипання до поверхні. У міру розмноження бактерій, вони більш міцно прилипають до поверхні, диференціюються, обмінюються генами, що забезпечує їх виживання.

3. Формування слизового захисного матриксу / біоплівки. Одного разу стійко приєднавшись, бактерії починають утворювати екзополісахаридний навколишній матрикс, відомий як позаклітинна полімерна речовина (extracellular polymeric substance). Це запобіжний матрикс або «слиз» (EPS-matrix). Дрібні колонії бактерій потім утворюють первісну біоплівку [9,10].

Вивільнення біоплівкових бактерій може бути активним чи пасивним [11]. Активне відторгнення пов'язано з механізмами, що протікають в самих бактеріях, тоді як пасивне зазвичай пов'язане з пошкодженням біоплівкового матриксу, відбуваючись під впливом зовнішніх факторів - плинину рідини; недостача або раптовий надлишок поживних речовин; присутність конкурентних бактерій і фагоцитуючих клітин; додавання хелатувальних агентів, біогенних і абіогенних детергентів; ферментів, що розщеплюють молекулярну основу біоплівкового матриксу; чинників, що порушують мережеву зв'язку, які необхідні для підтримки структури біоплівки [12]. Вивільнення бактерій підвищує їх чутливість до антибіотиків і ефektorів імунітету. Це означає, що комплексний (активний і пасивний) вплив на

біоплівковий процес може стати основою для боротьби з біоплівками [13,14,15]. Нижче мова піде про пасивне руйнування біоплівки, тобто про вивільнення біоплівкових бактерій, яке пов'язано з руйнуванням матриксу. Полімерний матрикс оточує біоплівку, сприяючи її міжклітинним контактам, зв'язку з навколишнім середовищем, і в кінцевому рахунку визначає здатність бактерій до виживання [16]. Основними компонентами матриксу є позаклітинні полісахариди, білки і нуклеїнові кислоти. Тому все, що діє на них, буде запобігати розвитку біоплівкового процесу або руйнувати готову біоплівку.

## **1.2 Антибіоплівкові речовини.**

Одним з добре вивчених матрикс-деградуючих ферментів є дисперсин В - глікозидгідролаза, який продукується *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [12]. Дисперсин В руйнує один з головних матриксних полісахаридів, полі-N-ацетилглюкозамін, перешкоджаючи утворенню біоплівки і не сприймаючи її у полі-N-ацетилглюкозамін-утворюючих видів бактерій. На жаль, *Ps. aeruginosa* належить до бактерій, які позбавлені полі-N-ацетилглюкозаміну. Їх біоплівка не тільки витримує дію дисперсину В, але він навіть посилює процес утворення біоплівки *Ps. aeruginosa* [17]. Мукоїдний (альгінатний) матрикс *Ps. aeruginosa* руйнується власним ферментом, альгінатліазою, забезпечуючи відкріплення вільних бактерій і роблячи їх більш чутливими до антибіотиків. Матриксні компоненти *Ps. aeruginosa* і *Burkholderia cenocepacia* руйнуються полісахаридними ліазами, виділеними з природних штамів роду *Bacillus* [18]. Вплив бактеріальних гідролаз на матриксний полісахарид Psl веде до утворення порожніх просторів в центрі біоплівкових мікроколоній і вивільненню планктонних клітин *Ps. aeruginosa* [17]. Присутність білків передбачає чутливість біоплівкового матриксу до протеолітичних ферментів [19]. Згідно з опублікованими даними, трипсин викликає відторгнення біоплівки *Ps. aeruginosa*. У субінгібіторних концентраціях (0,5 5,0 мг / мл) N-

ацетилцистеїн (клінічно визнаний муколітик з антибактеріальними властивостями) викликає відторгнення біоплівки *Ps. auruginosa*, знижуючи продукцію матриксних полісахаридів [20]. Механізм його антибіопліркової дії залишається невідомим. У дозуванні 10 мг / мл N-ацетилцистеїн приводив до повного придушення біопліркового процесу, але в цій концентрації він діяв і як бактрецидний агент, вбиваючи більшість бактерій Тец та ін. [21] показали, що 24-годинна біоплірка *Ps. auruginosa* (як і ряду інших бактерій) чутлива до ДНК-ази I. Це узгоджується зі спостереженнями про те, що рання біоплірка (12- 60 год) *Ps. auruginosa* руйнується ДНК-азою I, але вона майже не діє на 84-годинну біоплірку . Показано, наприклад, що ДНК стає резистентною до ДНКазы I після сорбції на білкових і мінеральних носіях [22]. Стійкість до ДНК-ази може викликати її руйнування протеолітичними ферментами, які присутні в зрілої біоплірки . У будь-якому випадку це говорить про особливості біопліркового фенотипу в різні періоди його розвитку. Також слід додати, що достатньо дієвим антибіоплірконим ферментом є альфа амілаза [23] , адже в дослідженні Кандарпа та ін. було доведено, що необхідно, лише 3,12 мкг / мл альфа-амілази , щоб повністю зруйнувати біоплірки. Також в якості антибіопліркових агентів використовують найрізномантніші речовини, але серед тих, які будуть описані нище слід виділити антибіотики, ПАР, ферменти та полісахариди, адже вони є найбільш дієвими речовинами в якості антибіопліркових агентів, більш детальний опис та біосинтез яких описаний в наступному розділі.

## РОЗДІЛ 2 . Продукти мікробного синтезу як агенти для руйнування біоплівки

### 2.1 Мікробні антибіотики, як агенти для руйнування біоплівок.

У дослідженнях [24,25] було створене похідне нізину з посиленою протимікробною активністю проти *S. pseudintermedius*. Крім того, нове похідне нізину демонструє посилену здатність погіршувати формування біоплівки та зменшувати щільність створених біоплівок. Діяльність цього пептиду являє собою значне покращення порівняно з пептидом нізину дикого типу і заслуговує подальших досліджень з метою їх використання для лікування *S. pseudintermedius* інфекцій. Синтезований даний нізін був за допомогою *L. lactis*, даний штам вирощували на відварі M17, доповненому 0,5% глюкозою (GM17) або агаром GM17 при 30 ° C.

Рабінг та Женг [26], протягом 2015 року дослідили нові антибіоплівкові агенти, що містять такі фрагменти, як імідазол, феноли, індол, триазол, сульфід, фуранон, бромопірол, тощо, можуть диспергувати бактеріальні біоплівки, було досліджено ряд властивостей даних речовин, і було виявлено, що синтезовані тріазоли 2-аміноімідазолу інгібують формування біоплівки *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) і *Staphylococcus aureus* (MRSA) вище 94% при початковій концентрації 100 мкМ. Також в даному огляді було розглянуто вплив індолу, а саме Утворення біоплівки H7 та рухливість бактерій пригнічується індолом у концентрації 500 μ M [26], ряд інших вчених [27] запропонував біосинтез індолу за допомогою мутанта *E.coli* на середовищі наступного складу: 200 мл розчину I (6 г екстракту дріжджів плюс H<sub>2</sub>O до кінцевого об'єму 200 мл), 200мл розчину II (3,75 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8,4 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> та 4,6 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, плюс H<sub>2</sub>O до кінцевого об'єму 200 мл), 15 мл 40% розчину глюкози, 4,8 мл 1M MgSO, 2,4 мл розчин мікроелементів, 2,4 мл вітамінів і розчину мінералів, 775 мл H<sub>2</sub>O, ампіцилін до 100 мкг / мл,

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Щербина І.С.			<i>РОЗДІЛ 2</i>	Літ.	Арк.	Аркуші
Перевір.		Стабніков В.П.					13	100
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

і 200 мкл піногасника.

Зовсім нещодавно в 2020 році вченими з Ірландії [28] було доведено, що ванкоміцин разом з нізином А разом диспергують клітини *Staphylococcus aureus* APC3819Н більш дієво, в той час коли окремо один від одного вони не впливають на біоплівки взагалі, тобто не є ефективними і не руйнують утворення біоплівок, біоситнез нізину А було вказано вище в статті [24], а біосинтез ванкоміцину є вже давно відомим. В статті [29] вказано, що ванкоміцин було синтезовано за допомогою *Amycolatopsis mediterranei* DSM590. Ферментували даний мікроорганізм в рідкому середовищі з 50 мг мл 1 еритроміцину (вихід: 3,1 мг (SP-969) та 2,2 мг (SP-1134) на 1 л культурального середовища).

У статті [30] була описана оптимізація умов культивування для виробництва, саме ванкоміцину за допомогою *Amycolatopsis orientalis* KCCM-10836P, ідентифікованого штамми з високим рівнем продукування ванкоміцину. Серед тестованих умовних ключових факторів, що впливають на біосинтез ванкоміцину, були рН та навантаження розчиненої кислоти (DOT). Коли рН і DOT контролювались на рівні 7,0 і 20-30%, відповідно, маса сухих клітин становило (DCW) 62,0 г/л та продукція ванкоміцину становила 11,5 г/л дані результати були отримані протягом 120 годин культивування. Виробництво ванкоміцину було збільшено від лабораторного (ферментатор на 7 л) до експериментального (300 л) та заводського масштабу (5000 л) із використанням швидкості на кінці робочого колеса у якості параметрів масштабування.

Таблиця 2.1

## Синтез мікробних антибіотиків для руйнування біоплівки

Синтезована речовина	Продуцент	Параметри культивування	Джерело вуглецю	Спектр антибіоплівкової дії	Дія на біоплівки	Джерело
Індол	<i>E.coli</i> FM5	Супернатант, 30°C, 12 год, перемішування.	Глюкоза	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	При 500 мкМ пригнічується утворення біоплівки.	Rabin,2015
Ванкоміцин	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM590	Супернатант, 37 °С, 24 год, середовище з додаванням еритроміцину	Декстрин	<i>S . aureus</i> , <i>S . salivarius</i> <i>S . lugdunensis</i>	При 256 мкг/мл спостерігається пригнічення утворення біоплівки	Angelopoulou,2020
	<i>Amycolatopsis orientalis</i> KCCM-10836P	Супернатант, 34 °С 120 год, 250 об/хв.	Декстрин	<i>S . aureus</i>	При 256 мкг/мл спостерігається пригнічення утворення біоплівки	Jung, 2007

Нізин	<i>L. lactis</i> M17	Супернатант, 30°C, 20 год, перемішування	Глюкоза	<i>S. pseudintermedius</i>  DK729	При 0,625 мкМ (МК) значне зниження біомаси біоплівки	Field, 2015
-------	----------------------	--	---------	---	--	-------------

## 2.2 Мікробні полісахариди, як агенти для руйнування біоплівок

Останнім часом значно збільшується кількість публікацій, присвячених дослідженню мікроорганізмів, які синтезують різноманітні полісахариди для руйнування або інгібування розвитку мікробних біоплівок. Наприклад в літературному огляді [31] було наведено що бактеріальні позаклітинні полісахариди (екзополісахариди) опосередковують багато взаємодій між клітинами та поверхнею, тобто допомагають утворенню нових біоплівок. Але ряд останніх досліджень наведених в даному огляді виявив, що ряд бактеріальних полісахаридів пригнічують утворення та руйнують уже існуючі біоплівки, що дає змогу застосовувати ці екзополісахариди в промисловості та медицині. В даному огляді розглянуто вплив полісахаридів виділених з *E. coli* CFT073, *Vibrio sp.* QY101, *Lactobacillus acidophilus* A4 та інших на біоплівки, які утворювали *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* та *B. Cereus*. Також в даному огляді, запропонували думку про те, що дослідження різноманітного впливу полісахаридів на бактеріальні біоплівки тільки починається і в майбутньому, полісахариди будуть використовувати як антибіоплівки в медицині та промисловості на заміні або в допомогу антибіотичним речовинам.

Варто звернути увагу на ряд досліджень присвячених анбіоплівковій дії екзополісахаридів, які виділені з морських мікроорганізмів. Так в 2016 році було опубліковано статтю [32] в якій розглядається вплив на біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* екзополісахаридом, котрий був виділений з штамів морських бактерій, з відкладень Східно-Китайського моря. Дані штами морських бактерій культивували в морському бульйоні 2216E (5 г / л триптон, 1 г / л дріжджового екстракту, один літр фільтрованої морської води, рН доведений до 7,4-7,6), або в середовищі Лурія-Бертані. Виявилось, що основним продуцентом антибіоплівкового екзополісахариду є морська

бактерія *P. stutzeri* 273 , яку культивували при 28 °C протягом 48 год. з інтенсивним перемішуванням, після чого очищали згідно методу наведеного в статті [32]. Після проведення дослідів був винесений такий висновок, що утворення біоплівки або попередньо сформованої біоплівки на предметних скельцях значно зменшилася при концентрації 0,1 мкг / мл очищеного EPS273 і майже зникло при концентрації 0,5 мкг / мл.

Також повертаючись до теми морських бактерії слід зауважити, що в статті [33] було розглянуто екзополісахарид з антибіоплівковою дією, який був виділений з *Bacillus licheniformis* SP1, пов'язаного з морською губкою *Spongia officinalis*. Результати отримані в ході дослідження ясно показують, що антибіоплівкова активність підвищується в міру збільшення концентрації надосадової рідини. Культивували *B. licheniformis* SP1 на середовищі з триптонно-дріжжовим агаром при 37°C протягом 2 діб, після чого належним чином виділяли супернатант з даного штаму для проведення наступних досліджень. Антибіоплівкова активність супернатанта з *Bacillus licheniformis* SP1 проти двох тестових штамів була порівнянна і була трохи вище для *E. coli* PHL628, оскільки в присутності 5% (об. / об.) супернатанту інгібування становило близько 89% і 80% на біоплівки сформовані *E. coli* PHL 628 і *Pseudomonas fluorescens* відповідно . Тобто морська біота є потенційним джерелом виділення нових з'єднань, що перешкоджають утворенню біоплівок. В даному дослідженні для порівняння було згадано штам морської бактерії *Vibrio sp.* QY101, котрий також продукує антибіоплівковий полісахарид під назвою A101 і був досліджений в статті [34] . Отримання полісахаридів здійснювали, як описано в статті [35]. клітини QY101 вирощували в альгінатному середовищі при струшуванні та при 25 ° C протягом 4 днів. Аналіз показав, що в присутності 100 мкг / мл A101 загальна поверхнево-зв'язана біомаса *P. aeruginosa* FRD1 впала до менш 5% від біомаси, вирощеної за відсутності A101, в той час як така ж обробка привела

до зниження поверхневої біомаси *S. aureus* RN6390 більш ніж на 99% , тобто діє ефективно А101 вибірково до різних біоплівок.

В статті Брайана-Джейссона [36] розглядали антибіоплівковий екзополісахарид , який був виділений з планктонних культур морських бактерій *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 відібраних в затоці Тулон (Франція) у Середземному морі. Формування біоплівки та отримання EPS проводили при температурі 20°C без перемішування в чашках Петрі , що містили спочатку 10 мл морського бульйону а після інкубації протягом 48 годин до кожної чашки Петрі додавали 10 мл свіжого МВ для підтримання культури. Після виділення відповідного Sol-екзополісахариду був проведений дослід на антибіоплівкову активність, який показав що у присутності розчину полісахариду вказаного вище в концентрації 250 мкг/мл утворення біоплівки не було або дуже сильно інгібувалось для п'яти з чотирьох досліджених штамів.

Продовжуючи тему актуальності досліджень антибіоплівкових екзополісахаридів варто взяти до уваги статтю китайських вчених від 2020 року [37] в якій було досліджено новітній екзополісахарид, що продукується *Lactobacillus coryniformis* NA-3. Штам лактобацил був культивований на агаризованому середовищі MRS при 37 ° C протягом 24 год в анаеробних умовах. Під час досліджень було показано що ЕПС-NA3 володів здатністю пригнічувати утворення біоплівки *B. cereus*, хоча в меншій мірі для *S. typhimurium*. Ступінь інгібування досягала 80%, і ефект залежав від концентрації в аналізах *B. cereus*, коли концентрації ЕПС-NA3 становили від 31,25 мкг / мл до 500 мкг / мл. Пригнічення утворення біоплівки *S. typhimurium* також залежало від концентрації, з коефіцієнтами інгібування від 9,71% до 40,87% з концентраціями EPS від 31,25 мкг / мл до 500 мкг / мл відповідно . Хоча EPS-NA3 успішно зменшував утворення біоплівки як *B. cereus*, так і *S. typhimurium*, він був більш ефективний проти *B. Cereus*. А от екзополісахарид виділений з *K. kingae* PУКК08 [38] в концентрації 10% по

об'єму показав майже повне пригнічення утворення біоплівки *S. Aureus*.  
Культивували штам РҮКК08 на триптон-соєвому бульйоні з додаванням 6 г / л дріжджового екстракту і 8 г / л глюкози, культуру *K. kingae* інкубували при 37 ° С протягом 2 днів.

Таблиця 2.2

## Синтез мікробних полісахаридів для руйнування біоплівки

Синтезована речовина	Продуцент	Параметри культивування	Джерело вуглецю	Спектр антибіоплівкової дії	Дія на біоплівки	Джерело
ЕПС 4,4 г\л	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> MD12-642	Супернатант, 37°C , 48 год, 200 об/хв	Картопляний крохмаль, агар	Широкий спектр дії.	В присутності 5% (об. / об.) супернатанту інгібування 80%	Роса, 2016
EPS 273	<i>P. stutzeri</i> 273	Супернатант, 28 °C 48 год інтенсивне перемішування	Пептон	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	При 0,1 мкг / мл пригнічується утворення біоплівки	Wu, 2016
EPS-NA3	<i>Lactobacillus coryniformis</i> NA-	Супернатант, 37 ° C, 24 год,	Декстроза	<i>Bacillus cereus</i> і <i>Salmonella typhimurium</i>	В присутності	Ху, 2020

	3	анаеробні умови			500 мкг / мл ЕПС зниження біомаси на 41%	
EPS A101	<i>Vibrio sp.</i> QY101	Супернатанат, 25 ° С, 96 год, перемішування	Дріжджови й екстракт	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	В присутності 100 мкг / мл А101 зниження біомаси на 99%	Guo, 2010
Sol-EPS	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i> TC14	Супернатанат, 20 ° С, 48 год, без перемішування	Гліцерин	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8, <i>Shewanella sp.</i> TC9, <i>Alteromonas genovensis</i> TC12 і <i>Pseudoalteromonas sp.</i> TC15	При 250 мкг/мл інгібування утворення біоплівки	Brian- Jaisson, 2016
ЕПС	<i>K. kingae</i> PYKK08	Супернатанат, 37 ° С, 48 год, перемішування	Глюкоза, пептон	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i>	При 10% по об'єму повне пригнічення утворення	Bendaou d, 2011

				<i>epidermidis</i>	БІОПЛІВОК	
--	--	--	--	--------------------	-----------	--

## 2.3 Мікробні ферменти, як агенти для руйнування біоплівки

Станом на сьогоднішній день, розглянуто безліч ферментів, які в різній мірі та з різними механізмами дії руйнують та чинять вплив на біоплівки, але в огляді представленому в статті 2017 року [39] вчені розглядають ряд таких ферментів як: нуклеази, протеази, полісахарид- руйнуючі ферменти саме як новітній спосіб для боротьби з мікробними біоплівками. Також в статті [40] були запропоновані Дисперсин та ДНКаза 1, як агенти для руйнування мікробних біоплівок. Декілька з ферментів з представлених вище груп, будуть розглянуті в даному розділі більше детально для розуміння їх дієвості і можливості застосування в медицині та промисловості. В 2017 році Німецькими вченими було видано статтю [41] , яка підтверджує данні наведені в статті вище стосовно боротьби з біоплівками *Listeria monocytogenes* за допомогою ДНКази 1 та інших анбіоплівкових агентів також в даній статті наведено декілька можливих , дієвих стратегій для боротьби саме з штамами *Listeria*.

За даними ресурсу PubMed [42] перша стаття стосовно антибіоплівкової дії альгінат-ліази датується 1994 роком, в ній коротко було описано, що за допомогою цієї ліази виділеної з *Pseudomonas aeruginosa* 8822 можливо здійснювати вплив на мікробні плівки шляхом руйнування альгінати за допомогою якого мікроорганізми прикріплюються до поверхні, утворюючи біоплівку. Це послуговало розвитком для створення нових досліджень стосовно антибіоплівкової дії даного ферменту, створення більше продуктивних рекомбінантних штамів та створення біосинтезу альгінат-ліази в промислових масштабах. В сучасний час проведено багато досліджень стосовно пошуку та виділення мікроорганізмів, які будуть найкращими продуцентами альгінат-ліази з максимальною продуктивністю та оптимальною швидкістю процесу біосинтезу. Так в статті канадських вчених [43] було розглянуто морський штам *Pseudoalteromonas sp.* 1400 , який культивували на селекційному середовищі з 1,8% альгінату натрію протягом

24 год при рН 8 і температурі 25 ° С. Після очищення ферменту значення питомої активності становило 106 од/мг білка. Під час дослідження антибіоплівкової активності було показано, що обробка супернатантом *Pseudoalteromonas sp.* 1400с привела до зниження біомаси біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* 14 на 69% через 24 години інкубації.

Вчені Банар та ін. в 2019 році опублікували статтю [44] в якій було розглянуто вплив літикази і  $\beta$ -глюкозидази на біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*. Було доведено, що при обидва ферменти є достатньо дієвими проти біоплівок *P. aeruginosa*, але літиказа показала більшу ефективність в ході дослідження і було зроблено висновок, що дані ферменти можуть бути застосовані в медицині для деградації біоплівок у пацієнтів з опіками. В статті [45] було доведено, що альгінат-ліаза проявляє синергійну активність до антибіотика тобраміцину, тобто сприяє його антибіоплівковій дії і покращує деструкцію біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* FRD1. Фермент був отриманий з рекомбінантного штаму *E.coli* H188A, який був сконструюваний також в даній статті і культивувався на середовищі Лурія-Бертані з додавання 30 мкг/мл кінаміцину протягом ночі при 30 ° С. Продуктивність даного мікроорганізму склала 15 мг / л культури при чому ступінь очистки ферменту складала більше 90%. При дослідженні антибіоплівкової дії було показано, що при застосуванні тільки алгінат-ліази в концентрації 1000 мкг / мл біомаса біоплівки знизилась на 40%, а при застосування алгінат ліази в заданій концентрації разом з тобраміцином в такі же концентрації привело до повного знищення існуючої біоплівки.

Вчені в статті [46] довели, що ДНКаза є достатньо дієвим антибіоплівковим ферментом, який діє на біоплівки *Candida Albicans* та інших мікроорганізми роду *Candida*. Цей фермент був виділений з *V. alginolyticus* AMS-II (зразок був взятий з узбережжя Бенгальської затоки), даний штам культивували на 10% бульйоні Zobell Marine протягом ночі при 28 ° С. Відзначено зниження біомаси біоплівки на 82% *C. albicans* при

використанні 5 мг/мл 1 ДНКазу I з підшлункової залози великої рогатої худоби (позитивний контроль) і зниження на 77% при використанні 5 мг / мл ДНКазу з *V. alginolyticus* AMS-II . Подібним чином, ДНКазу зменшила біомасу біоплівки на 81% та 76% для *C. glabrata* і для *C. Tropicalis*.

*Escherichia coli* O157: H7 - один з найважливіших патогенів у всьому світі. Тому вчені в статті [47] запропонували цілий ряд стратегій інгібування її біоплівки, серед яких значно виділяється дія на біоплівки ферментами мікроорганізмів. А от у дослідженні [48] було показано , саме вплив трьох різних типів ферментів: ДНКазу I, протеїназу K і целюлаза були оцінені на предмет інгібуючої або руйнуючої активності проти біоплівки *E. coli* O157: H7 шляхом впливу на позаклітинну ДНК, білки і целюлозу відповідно. У попередньо сформованих біоплівках всі ферменти показали значне зниження на 16,4-36,7% матриксу біоплівки в 10-кратно розведеному середовищі. Такого результату було досягнуто за допомогою комбінованого використання наведених вище ферментів.

У дослідженні [49] , де розглянуто Дисперсин Б з *A. actinomycetemcomitans* НК1651 було показано, що якщо іммобілізувати даний фермент на наночастках то ефективність інгібування формування біоплівок при концентрації Дисперсину Б 0,30 Од / мл становить 93,8 % в той час, як дія вільного ферменту становить 81,5%, культивування штамів утворюючих біоплівки *S. aureus*, *S. epidermidis* проходило протягом 24 годин . Тобто вільний фермент і так значно знижує формування біоплівки, але при застосуванні наночасток, можливо збільшити інгбууючу дію дисперсину. Продуцент даного ферменту *A. actinomycetemcomitans* НК1651 культивували на середовищі з триптонного соєвого бульйону при 37 ° С протягом 24 годин. В статті від 2020 року під авторством Мішра та ін. [50] було розглянуто природні антибіоплівкові агенти, серед ряду багатьох речовин особливу увагу було виділено ферментам мікроорганізмів та порівняння їх з іншими антибіоплівковими агентами. Раніше було проведено порівняння інгубуючої

дії дисперсину Б, лізостафіну та альфа амілази , яке наведено в статті Ірландських вчених за 2017 рік [51] . В даному огляді на біоплівки діяли в таких концентраціях: лізостафіну з *S. saprophyticus* - 4 мкг / мл, альфа-амілаза - 3,12 - 100 мкг / мл, дисперсину Б – 1 мкг / мл. В ході дослідження були отримані наступні результати: дисперсин Б (1 мкг / мл) успішно відокремив біоплівку *S. Aureus* SH1000 від проточних камер протягом 24 годин, Лізостафін, який націлений на пептидоглікан *S. aureus* і може викликати лізис клітин, був ефективним при видаленні *S. aureus* як MSSA, так і MRSA штаму протягом двох годин при концентрації 4 мкг / мл, тоді як концентрація 0,5 мкг / мл значно диспергувала *S. aureus* від поверхонь через 24 години. Протягом 24 годинного періоду лише 3.12 мкг / мл альфа-амілази було потрібно щоб зруйнувати біоплівки *S. aureus* SH1000. Але в даній статті не наведено біосинтезу жодного з перелічених вище ферментів. Натомість Бхатт та ін. в своєму огляді [52] детально описали очистку та біосинтез альфа-амілази , який продукується за допомогою *Bacillus velezensis* KB 2216. Культивували даний штам на середовищі наступного складу : 1% (мас. / Об.) ,пептон, 0,2% (мас. / Об.) дріжджовий екстракт, 1% (мас. / Об.), 1 % крохмаль і 1% (мас. / об.) NaCl при рН 5,5 максимальна активність альфа-амілази була досягнута до 418,25 Од / мл через 72 години інкубації.

Таблиця 2.3

## Синтез мікробних ферментів для руйнування біоплівки

Синтезована речовина	Продуцент	Параметри культивування	Джерело вуглецю	Спектр антибіоплівкової дії	Дія на біоплівки	Джерело
Алгінат-ліаза	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> 1400	Супернатант, 24 год, рН 8,25 °С	Алгінат	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Зменшення біомаси на 69% через 24 години інкубації	Daboor,2019
ДНКаза	<i>V. alginolyticus</i> AMS-II	Супернатант 12 год, 28 °С, перемішування	Агар	<i>Candida albicans</i>	Зниження біомаси біоплівки на 77% при використанні 5 мг / мл	Banu,2019
Алгінат-ліаза	<i>E.coli</i> H188A	Супернатант 12 год, 30 °С, перемішування	Триптон, дріжджовий	<i>P. aeruginosa</i> FR D1, <i>P.</i>	В концентрації 1000 мкг /	Lampra,2019

		я	екстракт	<i>aeruginosa</i> SM C406	мл біомаса біоплівки знизилась на 40%	
Альфа-амілаза	<i>Bacillus velezensis</i> KB 2216	Супернатант, 7 год, pH 5,5, 25 ° C	Пептон	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,12 мкг / мл альфа-амілази, щоб зруйнувати біоплівки	Kandarp, 2020
Дисперсин Б	<i>A. actinomycetemcomitans</i> НК1651	Супернатант 24 год, 37 ° C		<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> і <i>A. actinomycetemcomitans</i>	інгібування формування біоплівок при 0,30 Од / мл становить 93,8 %	Tan, 2015

## 2.4 Мікробні ПАР, як агенти для руйнування біоплівок

Станом на сьогоднішній день на ресурсі PubMed [53] під час пошуку за темою антибіоплівкові ПАР наведено більше 100 статей за даною темою, що говорить про те, що дана тема є достатньо поширеною і використання ПАР саме як агента для руйнування біоплівок має право на існування та розвиток в сучасній науці, слід звернути увагу й на те, що більшість статей за даною темою датується на 2017-2020 рік, що свідчить про беззаперечну актуальність даної теми у наукових статтях. Після огляду статей за минулі роки було обрано декілька сучасних статей огляд на які наведено нижче: У дослідженні вчених з США [54] було розглянуто *P. aeruginosa* штам CR1, виділений із ґрунту ризосфери, який культивували для отримання моно-рамноліпідів (Біоповерхнево-активна речовина) . Штам CR1 продукував біологічно активну речовину RL (рамноліпід), яка ефективно емульгувала вуглеводні, виявляла гемоліз та інгібувала біоплівку *Bacillus subtilis*. При температурі 37 ° С та при перемішуванні 200 об / хв штам CR1 виключно продукував рамноліпід у концентрації 21,77 г/л на середовищі гліцерином 10 г/л з поправкою на середовище Лурія-Бертані (LB) та 19,22 г/л відповідно на базальному середовищі з поправкою на олію рисових висівок 10 г/л відповідно через 54 год росту. Окрім того, виробництво рамноліпиду не зазнало впливу різних джерел азоту. Оцінка антибіоплівкової активності очищеного ПАР при різних концентраціях (10, 50 і 100 нг/мкл ) показала, що ПАР в концентрації 10 нг/ мкл не була ефективною для пригнічення утворення біоплівки *B. amyloliquefaciens* CD16 та *B. velezensis* 5 , тоді як 50 нг/мкл і 100 н/ мкл ефективно інгібує 80% утворення біоплівки *B. amyloliquefaciens* CD16 та *B. velezensis* 5 Крім того 10 нг/мкл ПАР було достатньо для того, щоб інгібувати 50% утворення біоплівки до *B. subtilis* MBGLi97, одночасно збільшуючи концентрації до 50 і 100 нг/мкл

формування біоплівки зменшилось на 80%. Ці результати свідчать про те, що дану ПАР можна використовувати для розробки ліків для запобігання утворенню біоплівки на поверхнях медичного обладнання, які є основним джерелом внутрішньолікарняних інфекцій.

В дослідженні Чеббі [55] також розглядали рамноліміди як ПАР для руйнування біоплівки. Ця стаття спрямована на дослідження виробництва біоповерхнево-активних речовин із використанням різних штамів, виділених з промислових екосистем з основними молекулами ПАР. Цікаво, що було досліджено саме датність рамноліпідів *P. Aeruginosa* W10 інгібувати утворення біоплівки та порушувати біозабруднення на поверхнях з нержавіючої сталі, спричинене *B. licheniformis* CAN55, *S. capitis* SH6 . Культивували штам W10 на мінімальному сольовому середовищі (MCM) з додаванням розчину мікроелементів та гліцерину в концентрації 2 % (об / об). Інкубацію проводили при 37 ° C та 180 об / хв протягом 5 днів для рамноліпідів, після чого було виділено 9,7 г/л ПАР. Антибіоплівка та антиадгезивна активність рамноліпиду W10 були протестовані протягом 48 год на біоплівкових штаммах . Рамноліпід W10 демонстрував приблизно 60% інгібування *B. licheniformis* і *S. capitis* біоплівки навіть при найнижчій концентрації використовуваної біоповерхневої речовини (0,04 мг/мл ), ця дія зростає майже до 90% при вищих концентраціях (3,125 мг/мл). Це свідчить про те, що дана ПАР має значну антибіоплівкову та антиадгезивну активність що дає змогу використовувати його в медицині та промисловості.

В недавньому дослідженні Хамзи та ін. [56]. Було повідомлено про здатність морського ізоляту *Staphylococcus lentus* SZ2 у виробництві гліколіпідної біоповерхневої речовини (BSSLSZ2) з антибіотичної та антибіоплівковою активністю. В наступному їх дослідженні [57], наведеному нижче було розглянуто , що після спільного з *V. harveyi*, *Staphylococcus lentus* SZ2 може виробляти підвищену кількість BS-SLSZ2. У цій роботі описано інгібування біоплівки шляхом культивування при

спільній культурі з *S. lentus*, покращення антибіофільного потенціалу *S. lentus* та посилене виробництво BS-SLSZ2 під час кокультури проти *V. Harveyi*. *S. lentus* і *V. harveyi* вирощували індивідуально в середовищі Лурія-Бертані протягом 24 год при 30 ° C. *S. lentus* та кокультури ( *S. lentus* і *V. harveyi*) при різних інтервалах часу оцінювали на предмет їх здатності запобігати біоплівкам *V. harveyi*. ПАР, отримані з монокультур після 6 год інкубації, змогли інгібувати біоплівки на  $11,84 \pm 5,38\%$ . CFS, отриманий з кокультур, інгібує біоплівки до  $42,43 \pm 3,28\%$  Подібна тенденція спостерігалась також через 12 год ( $39,4 \pm 7,13$  та  $66,97 \pm 1,71$ ) та 24 год ( $40,12 \pm 5,28$  та  $79,484 \pm 1,28$ ) інкубації для монокультури та кокультур, відповідно. Через 72 год інкубації інгібуюча активність була порівнянна ( $82,69 \pm 3,7\%$  та  $83,95 \pm 2,71$ , для монокультури та кокультури відповідно)

Таблиця 2.4

## Синтез мікробних ПАР для руйнування біоплівки

Синтезована речовина	Продуцент	Параметри культивування	Джерело вуглецю	Спектр антибіоплівкової дії	Дія на біоплівки	Джерело
Рамноліпід	<i>P. aeruginosa</i> CR1	Супернатант, 37°C , 54 год, 200 об/хв	Гідролізат казеїну	<i>Bacillus subtilis</i>	При 50 нг/мкл ефективно інгібує 80% утворення біоплівки	Sood,2019
Рамноліпід	<i>P. Aeruginosa</i> W10	Супернатант, 37°C , 120 год, 180 об/хв	Гліцерин	<i>Bacillus licheniformis</i> CAN55, <i>Staphylococcus capitis</i> SH6	60% інгібування при концентрації 0,04 мг/мл	Chebbi,2017
ПАР BS-SLSZ2	<i>Staphylococcus lentus</i> SZ2	Супернатант, 30°C , 24 год, перемішування	Гідролізат казеїну	<i>V. harveyi</i> і <i>P. aeruginosa</i> .	80% інгібування після 72 год.	Hamza,2017

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.

### 3.1 Передумови виробництва ЛЗ.

#### 3.1.1 Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.

Поверхнево-активні речовини мікробного походження (біосурфактанти) належать до типових амфифільних сполук, які знижують поверхневий та міжфазний натяг рідин [58]. БіоПАР є не менш ефективними, ніж синтетичні аналоги, оскільки не лише володіють широким спектром функціональної активності, а й мають ряд переваг, таких як біодеградабельність, нетоксичність, стабільність фізико-хімічних властивостей в широкому діапазоні температур, рН і солоності середовища. Важливою перевагою є можливість промислового синтезу біосурфактантів з використанням дешевої сировини, доступної у великих кількостях. Це можуть бути відходи харчової промисловості (олійножирові, спиртові, молочні), сільського господарства (крохмалевмісні відходи) тощо [59]. Завдяки цим корисним властивостям вони стали важливим біотехнологічним продуктом для промислового і медичного застосування. ПАР мікробного походження використовуються в якості емульгаторів, деемульгаторів, змочувальних і піноутворювальних агентів, функціональних харчових інгредієнтів і миючих засобів, а також у деяких випадках антимікробних агентів. Серед широкого спектру перспективних мікроорганізмів-продуцентів ПАР великої уваги заслуговують представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні поверхнево-активні гліколіпіди з високою поверхневою, емульгувальною, піноутворювальною активністю [60]. Вперше утворення сурфактантів (рамноліпідів) культурою *Pseudomonas aeruginosa* було показано Джарвісом і Джонсоном ще у 1949 році [61]

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Щербина І.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 3</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					33	100
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Рамноліпіди, синтезовані *Pseudomonas aeruginosa*, мають широкий спектр біологічної активності, зокрема, мають антимікробну і протипухлинну дію. Завдяки високій емульгує здатності вони ефективно можуть використовуватися для біоремедіації забруднених ґрунтів, підвищення нафтовіддачі. Біосурфактанти *Pseudomonas aeruginosa* є сумішшю рамноліпідів різної будови, серед яких основну частину складають ді-і монорамноліпіди, що містять по два залишки жирної кислоти і, перш за все β-гідроксидеканоіл-β-гідроксидеканоата (C10-C10). Дірамноліпіди краще розчиняються у воді, володіють вищою емульгує і протипухлинну активність. Рамноліпіди служать джерелом отримання L-рамнози, що входить до складу ароматичних і смакових добавок.

Завдяки своїй будові молекули і, відповідно, фізико-хімічним властивостям, рамноліпіди мають широке застосування: можуть використовуватися як для отримання нових, так і для вдосконалення існуючих препаратів для сільського господарства, косметики та медицини. БіоПАР можуть бути використані як самостійні реагенти, а також для створення комплексних препаратів із покращеними функціональними характеристиками. Із літературних даних можна виділити кілька основних напрямів застосування цих речовин: підвищення нафтовидобутку пластів; поліпшення горючих властивостей високоасфальтенових нафт; стабілізація і дестабілізація емульсій; очистка від нафтових забруднень води і ґрунтів; створення нових мийних та дезінфікуючих засобів засобів; у сільському господарстві в різних препаратах для захисту рослин від хвороб і шкідників; у медицині (створення ліпосом) та косметиці. В даній роботі буде розглянуто саме створення нових антибіоплівкових та дезінфікуючих засобів на основі рамноліпідів. [62].

БіоПАР у медицині та косметиці на сьогоднішній день практично не застосовуються, але вже є певні позитивні результати, які отримані у різних лабораторіях світу, що дають підстави їх розглядати як заміну синтетичним ПАР. Завдяки широкому спектру біологічних властивостей, а

саме антимікробним , антифунгіцидним , антивірусним , протипухлинним антиадгезивним , емульгуючим , біоПАР мають перспективи для одержання нових ефективних лікарських та косметичних засобів. [63]

### **3.1.2 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку**

Серед країн-виробників дезінфекційних та антибіоплівкових засобів лідирують вітчизняні виробники, які займають 59 % ринку. Дезінфекційні засоби на український ринок постачають фірми-виробники із 17 країн світу. Аналіз державного реєстру дозволив встановити частку кожної із країн-виробників у товарному асортименті. Серед країн-імпортерів лідируючу роль займають Бельгія (ТОВ «Еколаб») – 9 % ринку та Німеччина (В. BraunMelsungenAG) –6 %, Італія, Нідерланди, Словаччина, Росія та Білорусь по 4 %, Швейцарія – 3 %, Китай та Франція – 2 %. Швеція, Польща, Естонія, Ірландія, Румунія Чехія та Малайзія займають лише 1 % вітчизняного ринку. Найбільшу кількість на ринку займають розчини та гелі – 95 %, таблетки і серветки – по 2 %, порошки – 1%. При вивченні Державного реєстру було встановлено, що він містить 432 позиції товарів для дезінфекції та руйнування біоплівок у 2011 р., а в 2019 р. зареєстровано 222 товари, що говорить про зменшення насичення ринку засобами для дезінфекції та руйнування біоплівок [64].

### **3.1.3 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.**

Встановлено, що у 2019 р. в Україні зареєстровано 222 дезінфекційних та антибіоплівкових засоби . Вітчизняне виробництво їх забезпечують ТОВ «Бланідас», ТОВ «ВП «Біолонг», ПАТ «Дніпро-азот», ТОВ «БІОНІК», ПрАТ «Технолог», ТОВ «Інтердез», ТОВ «Владасепт», ТОВ «ДЕЗАНТ», ТОВ «ВІОЛА МЕДТЕХНІКА», ТОВ «Феліцата Україна», ТОВ Науково-виробниче підприємство «Біоцид», ТОВ Науково-технологічний центр «Вербена», ТОВ «Еколаб ТзОВ» на виробничих потужностях ТОВ «Інтерфілл», ТОВ «Українські Хімічні Техно-логії ЛТД», ТОВ

«ГРІНПАКС», ТОВ «МДМ», ТОВ «Делана», ТзОВ «ОРДЕМА», ТзОВ «АгроМаксі», ТОВ «ЛАБОРАТОРІЯ АНТИСЕПТИКИ», ТОВ «ІНДУСТРІАЛЬНЕ МИЮЧЕ ОБЛАДНАННЯ», ТОВ НВП «КРИСТАЛ ГАЛИЧИНА», ТОВ «ГРЕНЛАН-ДІЯ», ТОВ «Технохімреагент», ТОВ «Івахім», ТОВ «Торговий дім «Санітарний щит України», ТОВ «ХІЛЕР», ТОВ «Спецтехнологія», ТОВ «Фабрика аг-рохімікатів», ТОВ «ТОРГІВЕЛЬНО-ПРОМИСЛОВО-ВИЙ БУДИНОК «УСАДЬБА-АГРОХІМ», ТОВ «Лаверна», ПП «Фармацевтична фабрика «НФО «Ельфа», ТОВ «ХімСервісГруп», ТзОВ «Пологівський хімічний завод «Коагулянт» [65]

### **3.1.4 Потреба у цільовому продукті**

У даному курсовому проекті пропонується використання ПАР, а саме рамноліпиду, синтезованого *P. aeruginosa* W10 для професійної дезінфекції та очищення від біоплівки на поверхнях медичних інструментів, устаткування (гнучких та жорстких ендоскопів, інструментів до них), інших медичних виробів, наркозно-дихальної апаратури, у закладах охорони здоров'я і лікувально-профілактичних закладах усіх профілів. [66]

Всього в Україні знаходиться 1700 лікарняних закладів[9], які необхідно забезпечити даним дезінфекційним засобом. Для запобігання резистентності мікроорганізмами необхідно змінювати дезінфекційні засоби, тому приймаємо що забезпечувати дані заклади потрібно буде не на рік, а на 180 днів, оскільки буде використовуватись ще один інший засіб. Для забезпечення ефективного і повного очищення від біоплівки на поверхнях медичних інструментів, згідно статті [67] необхідно використовувати розчин ПАР з концентрацією 0,08 г/л. Під час приготування розчину для дезінфекцій, його об'єм має становити не менше 5 літрів за одне приготування і повинен він бути використаний протягом 15 діб. А лікарні в середньому за 15 діб використовують від 8 до 10 літрів такого засобу. [68] Тобто, на 180 днів необхідно 120 літрів засобу на одну лікарню, для обробки поверхонь устаткування. Оскільки таких лікарень 1700, то на забезпечення

50% від потреби всіх необхідно 102000 з літрів засобу , який в собі буде містити 0,08 г/л ПАР. Отже, для потреб міських лікарень необхідно :

$$102000 * 0,08 = 8,16 \text{ кг.}$$

### **3.2 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.**

Для потреб лікарських закладів України необхідно 8,16 кг рамноліпиду з *P. aeruginosa* W10. Оскільки дана ПАР буде використана лише для одного заводу , виробництво даної мікробної ПАР забезпечуватиме 100% розрахованої потреби.

Рамноліпід синтезується *P. aeruginosa* W10. Відомо, що максимальний вихід даного продукту становить 9,7 г/л [67].Враховуючи це, розрахуємо кількість культуральної рідини, яка необхідна для одержання 8,16 кг поверехнево-активної речовини (ПАР):

$$9,7 \text{ кг ПАР} - 1 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

$$8,16 \text{ кг ПАР} - X \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини,}$$

де X – кількість культуральної рідини для отримання необхідної кількості ПАР, м<sup>3</sup>.

$$Y = 8,16 / 9,7 = 0,84 \text{ м}^3$$

Враховуючи втрати при виділенні цільового продукту, який має бути хімічно чистим (20 %), об'єм культуральної рідини становить:

$$V_2 = 0,84 / (1 - 0,20) = 1,05 \text{ м}^3 = 1050 \text{ л культуральної рідини}$$

Отже, для виготовлення ПАР на потреби Київських міських лікарень необхідно 1050 л культуральної рідини.

Враховуючи загальну кількість культуральної рідини необхідної на рік, розрахуємо скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ( $T_{рд} = 45$ ). Інші 260 днів виробництво буде працювати для синтезу інших ПАР, як компонентів лікарських засобів.

Тоді кількість продукту на добу ( $V_{гпд}$ ) становитиме:

$$V_{гпд} = V_{гп} / T_{рд} = 1050 / 45 = 23,3 \text{ л/добу.}$$

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{гп} / ((V_{гпд} \times T_{цф}) / 24) = 1050 / ((23,3 \times 126,5) / 24) = 8,6 = 9 \text{ циклів,}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який складається з тривалості виробничого біосинтезу (120 год) та часу підготовчих операцій (6,5 год).

Підготовчі операції: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год).

Розраховуємо кількість культуральної рідини за цикл ( $V_{цк}$ ):

$$V_{кр} = (K_1 \times V_{гпд} \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 23,3 \times 126,5) / 24 = 135 \text{ л /цикл,}$$

де  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (приймаємо  $K_1 = 1,1$ ).

Такий об'єм культуральної рідини (135 л) можна отримати у ферментері з геометричним об'ємом:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{кр}}/K_3 = 135/0,55 = 245 \text{ л,}$$

де  $K_3$  – коефіцієнт заповнення ферментера ( $K_3 = 0,55$ ), що обирається в межах 0,5 – 0,65.

У ГОСТ 20680–2002 знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер  $V_{\text{нф}} = 250$  л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{ф}}/V_{\text{нф}} = 135/250 = 0,54.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у межах норми.

Отже, для отримання 135 л культуральної рідини обираємо ферментер об'ємом 250 л.

## РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ.

### 4.1 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

На сьогоднішній день залишається актуальним питанням пошуку ефективних та безпечних антибіоплівкових сполук, які б перешкождали адгезії мікроорганізмів до поверхонь або ж руйнували вже існуючої біоплівки на різноманітних поверхнях. 65-80 % з усіх інфекційних захворювань спричиняються біоплівками, які формують бактерії на поверхнях різноманітного медичного імплантованого обладнання , наприклад : лінзи, різноманітні катетори, протези та інше. Сучасні технології руйнування мікробних біоплівок передбачають використання механічних, фізичних, хімічних і біологічних методів. В останні роки перевага надається біологічним методам завдяки їх високій ефективності, пролонгованій дії, безпечності для людини і навколишнього середовища.[69]

Для того, щоб обрати найефективнішого біологічного агента, необхідно порівняти їх. Порівняння здійснюється в 3 етапи.

На першому етапі вибору різні штами продуцентів порівнюються за показниками утворення антибіоплівкової речовини: концентрація цільового продукту, час за який вона утворена та склад поживного середовища необхідного для отримання даного продукту, всі ці данні наведені в *табл. 2.1*. Слід зазначити, що порівнювались продуценти ПАР, а саме рамноліпідів, оскільки згідно проведеного літературного дослідження було виявлено, що найменшу МІК щодо біоплівок (мінімальну інгібуючу концентрацію) мають рамноліпідів, тому для подальшого порівняння та вибору біологічного агента досліджували продуценти рамноліпідів.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 4</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Щербина І.С.</i>					40	100
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

При виборі даних біологічних агентів особлива увага приділялася кількості та типу утвореного продукту та часу за який його було утворено.

Так штам *P. aeruginosa* #112 продукує рамноліпіди , які проявляють антиоксиданту та інгібуючу біоплівку дію і за 144 годин , даний штам продукує 3,2 г рамноліпідів [70], що в порівнянні з іншими мікроорганізмами доволі небагато, але цікавим фактом є, що для культивування даного мікроорганізму застосовують лише два компоненти ,а саме: мелясу та кукурудзяний екстракт, з чого випливає що даний продуцент можливо культивувати на відходах цукрового чи інших промислових виробництв, що в деяких випадках буде доцільним знищенням відходів виробництва. . *P. aeruginosa* W10 продукує мікробні ПАР, а саме рамноліпіди , які останнім часом показали себе як сильно діючі антиадгезивні та антибіоплівкові речовини. Даний штам , згідно статті [67] продукує 9,7 г/л протягом 120 год на середовищі, яке доповнене гліцерином, що дає змогу здешевити поживне середовище, оскільки технічний гліцерин достатньо дешевий та належить до відходів деяких виробництв . Дослідження штаму *P.aeruginosa* CR1 та його ПАР , показало що він є доволі перспективним продуцентом антибіоплівкових речовин, оскільки продукує понад 20 г/л ПАР всього за 54 год [71] , але даний штам є ще не достатньо дослідженим для того, щоб його використовувати в промислових масштабах.

Таблиця 4.1

**Поживні середовища для культивування штамів мікроорганізмів, які продукують антибіоплівкові речовини.**

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація цільового продукту	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>P. aeruginosa</i> #112	Меляса – 100 г/л Кукурудзяний екстракт – 100 мл/л	Рамноліпід – 3,2 г/л	144 год.	Проходило культивування на середовищі з кукурудзяним екстрактом з додаванням меляси за перемішування 180 об / хв, при рН 7 та при 37 ° С . Виділення проходило за допомогою центрифугування.	Gudina, E. J., Rodrigues, A. I., Alves, E., Domingues, M. R., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R.. <i>Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation</i> . <i>Bioresource Technology</i> , - 2015. - 177, 87–93. doi:10.1016/j.biortech.2014.1.069 [70]
<i>P. aeruginosa</i> W10	NaNO <sub>3</sub> – 2 Гліцерин – 20 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,9, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 0,7,	Рамноліпід - 9,7 г/л	120 год.	Виробництво ПАР проводили на середовищі МСС доповненим гліцерином, культивування проводили 5 днів для рамноліпідів відповідно при 37 ° С та 180 об / хв, рН 6,6-7,2.	Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., ... Banat, I. M. <i>Rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa strain W10; as</i>

	<p>MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O - 0,4,  CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O - 0,1  FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O - 0,001 та  1 мл розчину  мікроелементів</p>				<p><i>antibiofilm/antibiofouling products for metal protection.</i> Journal of Basic Microbiology, – 2017. - V.57(5), P.364-375. doi:10.1002/jobm.201600658 [67]</p>
<p><i>P.aeruginosa</i> CR1</p>	<p>Гідролізат казеїну – 10  Дріжджовий екстракт – 5  NaCl – 10  Агар – 15  Олія рисових висівок - 3  Гліцерин – 10</p>	<p>Рамноліпід -  21,77 г/л</p>	<p>54 год.</p>	<p>Культивування проходило на середовищі Лурія-Бертані з додаванням гліцерину 10 г/л та олії рисових висівок при 37 ° С і 200 об / хв . Клітини відділяли центрифугуванням.</p>	<p>Sood, U., Singh, D. N., Hira, P., Lee, J.-K., Kalia, V. C., Lal, R., &amp; Shakarad, M. (2019). <i>Rapid and solitary production of monorhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier Pseudomonas aeruginosa strain CR1.</i> Journal of Biotechnology. – 2019. – V.307 ,P.98-106.doi:10.1016/j.jbiotec.2019.11.004 [71]</p>

На другому етапі порівнюється вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів (табл. 2.2).

З табл. 2.2 видно, що вартість 1 л середовища для культивування *P. aeruginosa* W10 в 2 і 12 разів нижча порівняно з вартістю 1 л середовища для культивування *P. aeruginosa* #112 та *P.aeruginosa* CR1, відповідно.

Таблиця 4.2

**Вартість поживних середовищ для культивування штамів мікроорганізмів, які продукують антибіоплівкові речовини.**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело (1, 2, 3, 4)*
<i>P. aeruginosa</i> #112	Меляса – 100	18	1,8	1
	Кукурудзяний екстракт – 100 мл	60	6	2
	Вартість 1 л середовища – 7,8 грн			
<i>P. aeruginosa</i> W10	NaNO <sub>3</sub> – 2	50	0,1	5
	Гліцерин – 20 мл	158	3,16	11
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,9	120	0,10	6
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 0,7	50	0,03	7
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O - 0,4	10	0,004	8
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O - 0,1	190	0,02	9
	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O - 0,001	230	0,002	10
Вартість 1 л середовища – 3,4 грн.				
<i>P.aeruginos</i> a CR1	Гідролізат казеїну – 10	1100	11	3
	Дріжджовий екстракт – 5	1200	6	3
	NaCl – 10	5	0,05	4
	Агар – 15	1344	20,16	2

	Гліцерин – 10 мл	158	1,58	11
	Олія рисових висівок – 3 мл	350	1,05	12
Вартість 1 л середовища – 39,84 грн				

Примітка: \* – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на травень 2021 р.:

1. <https://harkov.flagma.ua/uk/melyasa-malyas-patoka-buryakova-o3412141.html>
2. <https://kiev.prom.ua/p1310282824-ekstrakt-kukuruznyj-litrov.html?&primelead=MC40>
3. <http://farmaktiv.com.ua/index.php/ua/prajs-list> ;
4. <https://prom.ua/p992698570-pischevaya-sol-ekstra.html?>
5. <https://kiev.prom.ua/ua/p1090613978-natrij-azotnokislyj-nitrat.html?&primelead=MC41>
6. <https://kiev.prom.ua/ua/p880226029-natrij-gidrofosfatnatrij-fosfornokislyj.html?>
7. <https://kiev.prom.ua/ua/p1059869951-monofosfat-kaliya.html?>
8. [https://novohim.com.ua/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/magnij-ternokislyj-7-vodnyj/?attribute\\_fasovka=5%20%D0%BA%D0%B3&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkpuIa4LtOnV-aTPSvfbdo\\_5pH9YQ-N09JdkFk5efjUB5BEcP6j0sR0CkY4QAvD\\_BwE](https://novohim.com.ua/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/magnij-ternokislyj-7-vodnyj/?attribute_fasovka=5%20%D0%BA%D0%B3&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkpuIa4LtOnV-aTPSvfbdo_5pH9YQ-N09JdkFk5efjUB5BEcP6j0sR0CkY4QAvD_BwE)
9. <https://aquasmile.com.ua/shop/product/reaktiv-dlia-balling-metoda-kaltsii-hloristy-bezvodnyi-cacl2-500-g/>
10. [http://www.arowana-im.com.ua/product\\_info.php?cPath=72\\_260&products\\_id=11201](http://www.arowana-im.com.ua/product_info.php?cPath=72_260&products_id=11201)
11. <https://kiev.prom.ua/ua/p1215917100-glitserin-glitserin-litr.html?>
12. <https://kiev.prom.ua/ua/p41403065-rastitelnoe-maslo-risovyh.html?>

На третьому етапі продуценти порівнюються за умовною вартістю 1 г утвореної ними антибіоплікової речовини (табл. 2.3).

З даних наведених у табл. 2.3 видно, що найменшу умовну вартість 1 г продукту має , *P. aeruginosa* W10, який продукує рамноліпіди. Слід відмітити, що концентрація цільового продукту синтезованого за годину у даного штаму нижча у порівнянні з деякими наведеними в таблиці мікроорганізмами , але середовище на якому культивується *P. aeruginosa* W10 і умовна ціна 1 г продукту наскільки нижча, що доцільніше буде використовувати саме його для отримання антибіоплівкових речовин, а саме рамноліпідів.

Таблиця 4.3

**Умовна вартість 1 г продукту при культивуванні штамів мікроорганізмів, які продукують антибіоплівкові речовини.**

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г продукту, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація продукту, синтезованого за год, г/л
<i>P. aeruginosa</i> #112	7,8	3,2	2,44	144	0,02
<i>P. aeruginosa</i> W10	3,4	9,7	0,35	120	0,08
<i>P.aeruginosa</i> CR1	39,84	21,77	1,83	54	0,4

Підсумовуючи дані, наведені у табл. 2.1, табл. 2.2 і табл. 2.3, продуцентом антибіоплівкових речовин обирається штам *P. aeruginosa* W10, оскільки, він вирощується на порядок дешевшому середовищі, яке складається з дешевих солей в не великій концентрації також він має найнижчу умовну вартість 1 г продукту, лише 0,35 грн, хоча і синтезує незначну кількість продукту за годину.

Слід відмітити, що перспективним продуцентом є штам *P.aeruginosa* CR1, який продукує 21,7 г рамноліпідів, тобто має доволі велику продуктивність в порівнянні з вище наведеними штамми. Але зважаючи на те, що 1 л середовища, на якому вирощується даний продуцент коштує в 12 разів дорожче від ціни 1 л середовища для культивування *P. aeruginosa* W10, він не був обраний продуцентом цільового продукту. Даного недоліку (вартість поживного середовища) можна позбавитися реалізуючи культивування *P.aeruginosa* CR1 на середовищах з дешевої продукції, дослідження зміни середовищ та умов культивування саме для цього мікроорганізму вже наведені в декількох статтях [71], тому в майбутньому він може замінити обраний мною продуцент, оскільки буде дешевшим і ефективнішим.

## 4.2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СПОСОБУ КУЛЬТИВУВАННЯ І ТИПУ ФЕРМЕНТЕРА

Виробництво ПАР можна здійснювати періодичним і безперервним способами.[67] Під час періодичного процесу можна досягти більш повного споживання субстрату мікроорганізмами, внаслідок того, що субстрат вноситься лише один раз і споживається продуцентом протягом усього часу культивування. На відміну від періодичного процесу під час безперервного можливе вимивання ще неспожитого середовища з ферментера. Оскільки йде накопичення ПАР, то кількість біомаси дуже не значна, а під час безперервного процесу культивування може також вимиватися біомаса, що призведе до значного зменшення кількості цільового продукту. Зважаючи на це обирається періодичний спосіб культивування.

Культивування продуцента може здійснюватися поверхневим або глибинним способами [67]. Обираємо глибинний спосіб, оскільки, за допомогою цього способу можливо насинтезувати більше необхідної речовини даним мікроорганізмом з подальшим виділенням ПАР в чистому вигляді.

Як зазначається вище, *Pseudomonas aeruginosa* W10 – аеробний мікроорганізм, тому необхідна аерація під час культивування. 180 об/хв є оптимальною швидкістю перемішування для насичення середовища культивування киснем. Для забезпечення таких умов необхідно забезпечити ферментер барботером та мішалкою. В цьому випадку після засівання поживного середовища необхідно ввімкнути подачу підготовленого повітря та ввімкнути мішалку .

Для проведення культивування аеробного штаму бактерій *P Pseudomonas aeruginosa* W10 оптимальною є температура 36-37 °С, оскільки даний мікроорганізм є мезофілом. Оптимальним значенням рН для даного процесу буде рН = 6.6-7.2.[67] Такі умови є сприятливими для розвитку багатьох мезофільних та нейтрофільних мікроорганізмів. Також середовище, для культивування є складним (містить гліцерин та розчин мікроелементів) , що

також покращує розвиток на ньому різноманітних мікроорганізмів. Всі ці фактори підтверджують той факт, що *Pseudomonas aeruginosa* W10 необхідно культивувати в стерильних умовах. Для перешкодження контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, ферментери), комунікацій, поживних середовищ для культивування.

Отже, для виробництва рамноліпідів за допомогою даного мікроорганізму використовують глибинний метод культивування періодичним способом, що відбувається в стерильних умовах з аерацією середовища.

В залежності від умов культивування конструкція і облаштування ферментера може відрізнятись. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов. Аеробні умови будуть забезпечуватись шляхом подачі повітря в ферментер, та постійним перемішуванням.

Тому ферментер повинен бути забезпечений барботером для подачі газу, датчиком контролю  $pO_2$  (для підтвердження аеробних умов), газоаналізатором (для контролю кількості  $CO_2$ ).

Для того щоб інтенсифікувати масообмінні процеси, забезпечити необхідну аерацію та досягти кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач з частотою обертів 180 об/хв [67]. Існують лопатеві, турбінні, гвинтові, якірні, рамні та шнекові мішалки. Оскільки, культивування продуцента не передбачає встановлення перемішувача певної особливої конструкції і типу, то він обирається довільно. Тому можна обрати найпростішу та найдешевшу за конструкцією мішалку – лопатеву (шестилопатеву). Для запобігання утворенню піни, мішалка буде встановлюватись зверху апарата. Також, необхідно встановити в ферментер відбивні перегородки, які будуть запобігати утворенню воронки під час перемішування.[72]

Для того щоб забезпечити сталу температуру культивування ферментер необхідно оснастити сорочкою і термометром, для контролю температури. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком контролю рН.

Отже, для того щоб забезпечити необхідні умови культивування нам необхідний ферментер, який буде обладнаний шестилопатевою мішалкою, барботером, сорочкою, датчиками для контролю рН, рО<sub>2</sub>, газоаналізатором.

### 4.3 ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ

#### Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.

Серед перспективних біоПАР заслуговують на увагу рамноліпіди – гліколіпіди, синтезовані в основному бактеріями роду *Pseudomonas*. Хоча біоПАР привертають багато уваги, застосування обмежується, оскільки виробничі процеси їх отримання часто не є економічно конкурентними порівняно з синтетичними ПАР [73]. Це пояснюється високою вартістю субстратів, відносно низькою продуктивністю і неоптимізованими постферментаційними процесами. Рамноліпіди є основними гліколіпідами бактерій роду *Pseudomonas*. Вперше були виділені з продуктів синтезу *P.aeruginosa* в 1949 [74]. Бактерії роду *Pseudomonas* синтезують низку гомологічних рамноліпідів, в яких рамноза приєднана з жирнокислотним хвостом глікозидним зв'язком. Рамноліпіди різняться за кількістю β-гідроксижирних кислот (1 або 2), кількістю одиниць рамнози (1 або 2), довжиною ланцюга і 14 насиченістю β-гідроксижирних кислот. Основні гомологи - монорамноліпід (L-рамнозо-β-гідроксидеканоїл-β-гідроксидеканоат) і дирамноліпід (L-рамнозу-L-рамнозу-β-гідроксидеканоїл-β-гідроксидеканоат) [75], всього понад двадцять гомологів синтезує *P.aeruginosa* у менших кількостях [76]. Ефективні методи виділення цільових продуктів відіграють не менше значення, ніж оптимізація мікробного синтезу ПАР, при розробленні технологій їх масштабного виробництва [77]

Вважається, що на постферментаційні процеси (виділення кінцевих продуктів) припадає 60-80% витрат від загальної вартості виробництва біоПАР [78]. Це обумовлено головним чином складністю сумішей культуральних рідин, що містять клітини, різні позаклітинні метаболіти, а також низькими концентраціями цільових продуктів.

### **Обґрунтування відділення культуральної рідини від біомаси**

Для відділення бактеріальної біомаси застосовуються такі методи розділення: флотація, фільтрація, ультрафільтрація, центрифугування, екстракція, діаліз, хроматографія.

**Флоатація** є одним із видів бульбашкової адсорбційної сепарації, заснованої на утворенні плаваючих агломератів забруднюючих речовин із дисперсної газової фази та подальшого виділення у вигляді шламу [79].

Перевагами флоатації є:

- безперервність процесу,
- широкий спектр застосування,
- низькі інвестиційні та експлуатаційні витрати,
- лише апаратне забезпечення,
- селективність вилучення домішок з високою швидкістю обробки порівняно з вистоюванням,
- Можливість отримання шламу з низькою вологістю (90-95%), високим ступенем очищення (95-98%),
- Можливість відновлення вилучених речовин.

Метод флоатації використовується, коли генеративні клітини накопичуються в поверхневих шарах вмісту приладу через низьку змочуваність [80].

У цьому випадку цей метод не рекомендується, оскільки бактерії розсіяні по всій товщі культуральної рідини і погано відокремлюються флоатацією.

Ще одним недоліком є високі втрати біомаси до 15%, а також низький ступінь концентрації. Цей тип поділу не можна використовувати, оскільки кількість рамноліпідів безпосередньо залежить від кількості біомаси.

**Фільтрація.** Принцип роботи різноманітних застосовуваних на даний час фільтр-систем (барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри) заснований на одному і тому ж принципі – затримки біомаси за рахунок пористих фільтрувальних перегородок. Залежно від характеру процесу, який проводиться виділяють фільтри періодичної та безперервної дії. Вони можуть працювати за надлишкового тиску та під вакуумом.

Для фільтрів безперервної дії подання суспензії, вилучення осаду і вилучення фільтрату (або відведення загущеною суспензії) відбувається без зупинки. А в фільтрах періодичної дії ці стадії перериваються.

Недоліком даного способу є явище залипання клітин на фільтрі, та забивання пор фільтрувального елемента білками і іншими частинками, що знижує швидкість потоку рідини під час процесу фільтрування, що в свою чергу збільшує енерговитрати на підтримання процесу. Тому даний спосіб не є ефективним для бактеріальної культури[7].

**Ультрафільтрація** дозволяє видалити колоїдні та дрібнодисперсні домішки, мікроорганізми, бактерії та віруси, розчинені солі важких металів, заліза, ртуті, миш'яку, марганцю, свинцю та ін. Діаметр пір може досягати 0,02 мкм. Основна перевага – високий рівень очищення. Дуже зручний, якщо цільовий продукт знаходиться у культуральній рідині. У цьому випадку використання даного методу не рекомендується, оскільки цільовий продукт знаходиться на поверхні клітин, а не культуральної рідини. І, як і у випадку звичайної фільтрації, будуть закупорюватись пори мембрани, що також вказує на малу ефективність даного процесу [81].

### **Центрифугування.**

Існує два основних типи центрифуг: нагнітальні та фільтраційні. Нагнітальні центрифуги використовуються для розділення емульсій і суспензій шляхом видалення дисперсних частинок під впливом відцентрових сил. У хімічній промисловості також широко застосовуються фільтрувальні центрифуги [79].

Якщо розділити центрифуги відповідно до їх призначення, можна розрізнити центрифуги з фільтрами та сепараторами.

Фільтрувальні центрифуги зазвичай оснащені барабанами, які з внутрішньої сторони обшиті тканинною або іншою фільтруючою перегородкою. Цей тип центрифуг використовується для розділення твердих і штучних речовин, а також суспензій з зернистою або твердокристалічною фазою. Центрифуги-сепаратори також оснащені міцною чашею. Цей тип центрифуг в основному використовується для поділу суспензійних концентратів і емульсій.

Цей метод вимагає дорожчого обладнання, ніж фільтрація, тому його використовують у таких випадках:

- а) суспензію фільтрують дуже повільно;
- б) необхідно максимально очистити культуральну рідину від частинок, що містяться в ньому;
- с) Хоча фільтри призначені для періодичної роботи, необхідно забезпечити безперервний процес поділу.

Фільтрація в цьому випадку не підходить, оскільки кількість продукту залежить від того, скільки біомаси нам потрібно відокремити з найменшими втратами. Тому для відділення біомаси від культуральної рідини зручніше використовувати фільтруючу центрифугу. Цей метод має ряд переваг:

- Немає необхідності в дорогих фільтруючих елементах
- Матеріал оброблений найменшою кількістю активної речовини
- Оскільки агрегати займають менше місця, процес легше автоматизувати, а обладнання легше чистити.

Отже, виходячи з вищенаведеної інформації для відділення біомаси від культуральної рідини найкраще застосовувати центрифугування. Так як об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію, є відносно не великим, і для відділення біомаси необхідно понад 10000 об/хв можливе використання центрифуги Biotechno серії CERA TZ-5[81].

### **Обґрунтування осаджувальної рідини**

Одним з найчастіше описаних методів виділення та очищення є підкислення супернатанту культуральної рідини до рН 2-3 із наступним охолодженням. Низький рН нейтралізує негативні заряди на молекулах, зменшуючи їх розчинність у водному розчині [82]. У патенті США 5656747 описано спосіб ефективного виділення рамноліпідів (до 98%), підкисленням до рН  $\leq 5$  з подальшим нагріванням до 60-130°C, охолодженням до 50 °C і нижче, і центрифугуванням для відділення рамноліпідної фази. Було також відзначено, що цей процес не буде відбуватися без стадії нагріву після підкислення [83]. Ще одним варіантом осадження біоПАР є висолювання внаслідок додавання сульфату амонію, як це описано для ліпопептидів штамів *B. subtilis* BP-9, *B. subtilis* BP-13 and *Bacillus species* PRIS-1 [84]. Fleurackers et al. описують спосіб виділення домішок, за допомогою якого жирні кислоти можна осадити  $\text{CaCl}_2$ . Жирні кислоти утворюють нерозчинні кальцієві солі, відділяють центрифугуванням [85]. Найбільш простий та ефективний метод було запропоновано [86] згідно з яким після кислотного осадження за допомогою 10% розчину  $\text{HCl}$  - наступним етапом є екстрагування суміші рамноліпідів етилацетатом, згідно з результатами даного дослідження таким методом можливо більш ефективно отримати рамноліпіди, тобто збільшити продуктивність процесу, саме даний принцип буде використовуватись в даній роботі.

Аналізуючи різні технологічні схеми виділення рамноліпідів, очевидне використання етилацетату або хлороформу для подальшої екстракції. Тому, саме цю рідину використовують в подальшому [87].

Використання інших рідин також дозволяється, але набагато рідше та в лабораторних умовах, оскільки в промислових масштабах інші речовини здорожчують технологію.

### **Обґрунтування екстрагування препарату**

Екстракція є найбільш поширеним методом, який використовується для кількісного виділення біоПАР. Селективність розчинника до біоПАР має вирішальне значення. Використовуючи полярні розчинники, такі як метил-трет-бутиловий ефір (МТБЕ) [88], етилацетат [89] або спирти [90] можна екстрагувати біоПАР з водних та інших гідрофільних середовищ. Для очищення рамноліпідів (для видалення залишкового субстрату) у першій екстракції використовують етилацетат, згідно розглянутих джерел та різноманітних технологічних процесів [91]. Оскільки органічні розчинники, як правило, токсичні, їх залишки не можуть бути присутніми в продукті і потребують додаткового видалення вакуумним випаровуванням. Загалом, токсичність розчинників слід враховувати при розробці процесу; етилацетат і МТБЕ як полярні розчинники є кращою альтернативою хлороформу, а н-гептан як неполярний може бути безпечнішим, ніж н-гексан. Отже, як екстрагент було обрано етилацетат, тому що він менш токсичний та є більш ефективним для виділення саме рамноліпідних комплексів.

### **Обґрунтування сушіння препарату**

Сушіння – це процес видалення вологи або рідин з твердих, рідких і газоподібних матеріалів (продуктів, препаратів). На даний момент з відомих сушарок, які розроблені для біотехнології, знайшли застосування такі типи сушарок: розпилювальні сушарки з дисковим та форсунковим розпиленням, вакуумні сушарки(вакуум-випарні шафи), вальцові сушарки , ліофільні

тобто сублимаційні сушарки (у виробництві бактеріальних препаратів, ферментів) та стрічкові. Методи сушіння і конструкції сушарок в великій мірі визначаються режимами сушіння для певного матеріалу, що в свою чергу забезпечує високу якість сухого продукту при найменших інвестиційних та енерговитратах. Це дуже характерно для продуктів мікробного синтезу, оптимальні режими та методи сушіння, яких можуть бути визначені тільки після вивчення фізико-хімічних і теплофізичних характеристик, та і біологічних властивостей. Специфічність сушіння пов'язана з порівняно низькою термостійкістю і вимогами максимально можливого зберігання цільових продуктів біосинтезу в препаратах, які будуть йти до споживача [92].

### **Розпилюючі сушарки**

У біотехнологічній промисловості в основному використовуються пластинчасті розпилювальні сушарки. Розпилювальна сушка створена для рідких продуктів (розчинів, суспензій, емульсій), що піддаються сушці. Під час сушки -повітря або димовий газ - вводиться в сушильну камеру, куди подається продукт, який висушують. За цих умов створюється велика поверхня випаровування висушеного продукту, яка добре контактує з теплоносієм, тому процес відбувається надзвичайно швидко. Час висихання 15-30 секунд. В результаті розпилювальні сушарки не псуються при високих температурах сам продукт, що призводить до утворення високоякісного дрібно подрібненого продукту.

Дискова сушарка підходить для суспензій і в'язких рідин, але вимагає великого споживання електроенергії. У розпилювальних сушарках зберігається хороший контакт із сушаркою, але об'єм сушильної камери повинен бути великим. Тому цей метод використовується у виробництві тільки , якщо продукт знаходиться у рідкому стані. [92].

### **Вакуумні сушарки**

Даний тип сушарок функціонує в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної форми, яка закривається герметично.

Перевагами саме такого типу сушарок є можливість сушіння матеріалів при відносно невисоких температурах також слід додати, що вони мають меншу витрату тепла, вони мають можливість уловлювати пари відновлювальних компонентів наприклад, таких як пари спиртів та різноманітних органічних рідин, відносно інших типів сушарок кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу, висока швидкість процесу, рівномірне висушування матеріалу, компактний та зручний апарат.

До недоліків таких сушарок слід віднести: велика необхідність застосування ручної праці, більші часові витрати на сушіння відносно розпилюючих сушарок, завантаження й вивантаження матеріалу вручну[92].

### **Вальцьові сушарки**

Вальцьові сушарки використовуються для сушіння пастоподібних матеріалів з одночасним утворенням висушеного матеріалу у вигляді таблеток і гранул певної форми. Поширеними стали атмосферні одно- та двовальцьові та вакуумні сушарки.

Сушарка працює безперервно, ручне завантаження повністю виключено, але конструкція підходить тільки для сушіння рідких і пастоподібних продуктів [93].

### **Ліофільні (сублімаційні) сушарки**

Сублімаційне сушіння - це процес видалення води із замороженого матеріалу. Лід сублімується безпосередньо в пару, минаючи рідку фазу. Процес проводять під вакуумом із заморожуванням продукту при температурі від 10 до 70°C.

Метою ліофілізації є одержання водорозчинної речовини. При додаванні води відновлена речовина повинна зберігати ті ж властивості, що й

вихідне, оскільки сублімаційне сушіння відбувається при охолодженні до дуже низьких температур, і можна висушити речовини, що не переносять високих температур, такі як білки, ферменти, вітаміни. і т.д [79] .

Метод ліофільного сушіння дозволяє отримувати сухі препарати без втрати їхньої кількісної та якісної цілісності, але до недоліків можна віднести високу вартість обладнання. Конструкція сублімаційної сушарки така ж , як у вакуумної.

### **Стрічкові сушарки**

Основним елементом даного типу сушарок є нескінченна горизонтальна стрічка, яка рухається в просторі. Матеріал надходить на один кінець стрічки і виходить з іншого. Досягнувши кінця смуги, вона виливається в нижню смугу і починає рух у протилежному напрямку. Цей рух повторюється кілька разів, поки матеріал не досягне первісної гідоти. Багатошарові стрічкові сушарки використовуються для сушіння сипучих і кристалічних виробів, вони не потребують ручної праці для завантаження і розвантаження виробів, вони досить компактні за умови невеликої продуктивності. Дані апарати можна використовувати як для великої, так і для малої кількості продуктів. Він простий у використанні. Недоліком є досить громіздкість та дороге обслуговування. [93].

### **Ротаційні сушарки**

Це тип сушарки, що використовується в промисловості для зменшення вмісту рідкої фази в матеріалах. Обертання полегшує вплив матеріалу на джерела тепла, що підвищують його температуру, що сприяє усуненню або зменшенню вмісту рідкої фази. Ротаційні сушарки складаються з металевого циліндра, барабана або скляної колби , яка обертається і має невеликий нахил для полегшення вивантаження матеріалу із сушарки. Сушарка встановлюється на бетонну основу або сталеві балки, які її підтримують. Матеріал висушується завдяки гарячій водяній або масляній бані , на якій розташовано безпосередньо ємність яку нагрівають Сушарка в більшість використовується на хімічних виробництвах для видалення рідини із зразків

шляхом випаровування, підходить для концентрату і очищення високотемпературного легко розкладаного матеріалу. Колба з рідиною яка випаровується, що обертається в похилому положенні навколо своєї осі, приєднана до водяного холодильника або до охолоджуваної льодом пастці і далі до джерела вакууму. При обертанні колби на її внутрішньої поверхні постійно утворюється плівка рідини, а зовнішня поверхня рівномірно нагрівається на бані. [93]

З наведених даних можна зробити висновок, що для висушування рамноліпідів після екстракції доцільніше застосовувати ротаційний випарник Titan Techniks, серії RE-52100F [94], оскільки в цього типу сушарок:

- проста експлуатація;
- достатня продуктивність;
- створені для висушування саме рідких компонентів ;
- рівномірне висушування;
- враховуючи, використання екстрагування перед висушуванням, найбільш доцільним буде вибір саме ротаційного випарника.

#### **4.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу (упаковки)**

У даній кваліфікаційній роботі пропонується використання ПАР, а саме рамноліпиду, синтезованого *P. aeruginosa* W10 для професійної дезінфекції та очищення від біоплівки на поверхнях медичних інструментів, устаткування (гнучких та жорстких ендоскопів, інструментів до них), інших медичних виробів, наркозно-дихальної апаратури, у закладах охорони здоров'я і лікувально-профілактичних закладах усіх профілів. [95] На ринку існує декілька аналогів продукту, який буде розроблено, а саме «Ензоклін» та «Гуасепт» [96] це водні розчини ферментів та полігексаметилгуанідину відповідно. Але для спрощення технології виробництва для зменшення ціни готового продукту пропонується

випускати даний продукт в формі порошку, оскільки дана товарна форма має ряд переваг:

- Простота і зручність застосування під час обробки різноманітних поверхонь та устаткування.
- Відносно просте та дешеве виготовлення даної товарної форми відносно інших , а саме сушіння, дроблення та подальше фасування та пакування.
- Швидка дезінфікуюча дія на всій поверхні оброблювального устаткування чи поверхні.
- Простота і швидкість приготування готового розчину для подальшої обробки.

## РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

### 5.1. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 5.1.

*Таблиця 5.1*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Н-17 Н-19 Н- 23 Н-26 Н-29	Насос	5	Відцентровий насос фірми DAB EURO продуктивністю від 25 до 80 л/хв [1]
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал –поліестер, швидкість фільтрування – 0,45 м/с, Е=90% [2]
К-3	Компресор	1	Компресор фірми «Airpol K7» (Польща), потужність 16 л/с, робочий тиск 1 МПа [3]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач Friulair AFR 11 (Італія) продуктивністю 66 м3/год [4]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер серії Р270.600 фірми «ЭНТЕХ» (Україна), об'єм 50 л, робочий тиск – 1 МПа [5]
Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник Titan WHR 300x150-2 фірми ЛИССАНТ (Росія), він складається з алюмінієвих пластин, до яких приєднуються мідні трубки діаметром 9,52 мм [6].

<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Щербина І.С.			
Перевір.	Стабніков В.П.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
<i>РОЗДІЛ 5</i>			Літ.	Арк.
				61
			Аркушів 100	
			6.	
<i>Кафедра БТМ</i>				

Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр ФВК клас F9, компанія Вэнт-електро (Росія), фільтруючий матеріал Nanomeltblown (поліпропіленові волокна), E = 95 % [7]
Р-8	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор об'ємом 12 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм( 4 лопатева мішалка), нержавіюча сталь( AISI 316L), швидкість перемішування 100 об/хв, внутрішній діаметр 260мм. [8]
Ф-14 Ф-16	Фільтри індивідуальної очистки	5	Фільтр РФМ-3,0, компанія ГеоСорб (Росія), фільтруючий матеріал – сополімер стирола , E = 99,99% [9]

*Продовження табл.5.1*

Д-9 Д-11	Дозатори	4	Дозатор виробництва НВП "Техноага" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. [10]
Р-10	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор-змішувач , оснащений перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 120 л, швидкість перемішування 50 об/хв. [11]
Р-12	Реактор-змішувач для гліцерину	1	Реактор об'ємом 10 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм( 4 лопатева мішалка), нержавіюча сталь( AISI 316L), швидкість перемішування 100 об/хв, габаритні розміри: 950×200×660. [14]
І-13	Інокулятор	1	Інокулятор New Brunswick BioFlo 310, для вирощування інокуляту, оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискання та автоматичним датчиком рівня піни. Швидкість перемішування до 150 об/хв. Об'єм 25 л. Виробник: (Росія). [12]
ФР-15	Виробничий ферментер	1	Ферментер барботажний об'ємом 250 л, оснащений 6-ти лопатевою дисковою мішалкою, матеріал робочої зони сталь AISI 316L, на кришці ферментера встановлений клапан DN 40 для завантаження, вивантаження здійснюється через клапан DN 25 санітарного типу з патрубком зливу з клапана, швидкість перемішування 180 об/хв, внутр. діаметр 700 мм. Додатково обладнаний: оглядовим вікном, клапанами DN 25 та DN 32, температурним датчиком, пробовідбірником ``Коєфіт`` DN 5, запобіжним клапаном, вбудованим модулем дозування газів [13]
З-18	Збірник культуральної	1	Збірник об'ємом 200 л , діаметр 0,8 м, висота 1,3 м. Оснащений сорочкою, виконаний з сталі AISI 316 L,

	рідини		Виробник : «Промвіт» (Україна) [15]
Ц-20	Центрифуга	1	Фільтруюча центрифуга Biotechno CEPA TZ-5. 10000 об/хв, мах навантаження 50 кг, d барабана 600мм, висота 350мм[16].
P-21	Реактор-змішувач	3	Реактор-змішувач об'ємом 150 л, , оснащений сорочкою та турбінною мішалкою з відбійниками, сталь AISI 316L. Габарити: 1300×700×1800[ Виробник: " Chemar AG" (Швейцарія)[17]
P-24 P-27 P-30	Реактор-змішувач	3	Реактор-змішувач об'ємом 300 л, , оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою з відбійниками, сталь AISI 316L. Габарити: 1200×1200×3000[ Виробник: "JCT" (Китай)[?]
Д-22 Д-25 Д-28 Д-31 Д-35	Дозатор об'ємно-ваговий	5	Дозатор FlexWX. напівавтоматичний дозатор для фасування рідких і сипких продуктів. Всі компоненти дозатора, які контактують з продуктом, виконані з нержавіючої сталі AISI 304/AISI 316 [18]
PВ-32	Ротаційний випарник	1	Ротаційна випарна сушарка фірми Titan Techniks, серії RE-52100F, оснащена 100 л випарною колбою, водяною банею та обертаючим пристроєм (до 120 об/хв), макс. темп. роботи 170°C, Габарити: 1520×620×2470[19]
ДР-33	Дробарка	1	Дробарка шокова приймає сировину розміром не більше 50 мм, продуктивність 200кг/год, потужність 1,1 кВт, габаритні розміри 640х340х600, маса апарату 160 кг, матеріал апарату сталь ЧХ16М2/110Г13Л [20].
ФМ-34	Фасувальна машина	1	Машина автоматичної фасовки в тришарові металізовані пакети 100 г ЛИНЕПАК Ф з системою автоматичної запайки, мах продуктивність 60 упак/хв,

			габарити: 3700×1000×1750 мм) [21]
--	--	--	-----------------------------------

**Примітка:** підбір обладнання відбувався за допомогою таких електронних ресурсів:

1. [http://www.pomp.com.ua/category\\_44.html](http://www.pomp.com.ua/category_44.html)
2. <https://air-filter.com.ua/filters/primary/pocket/tf25>
3. <http://www.airpol.com.pl/kategoria/3-kw-22-kw-wykonanie-standardowe/91>
4. [https://www.agrcomp.ru/item/ohladitely\\_vozduha\\_friulair](https://www.agrcomp.ru/item/ohladitely_vozduha_friulair)
5. <https://prom.ua/ua/p523000363-vozduhosbornik-resiver-dlya;all.html>
6. <https://www.climatik.su/ventiljacija/teploobmenniki/teploobmennik-titan-whr-300x150-2-dlya-pryamougolnykh-kanalov-vodyanoi.html>
7. <http://www.ventelectro.ru/ventilyaciya/fil-try/fil-try-tonkoj-ochistki/fil-tr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-klass-f5-f9-material-iz-nan/>
8. <https://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html>
9. <https://www.mtkisorbent.ru/filtryushchij-material-fpp-15-1-5-tkan-petryanova>
10. <http://technowagy.com.ua/product/dozatory-mnogokomponentnye/>
11. <https://promvit.com.ua/reaktory-120-l-dlya-zhlf-v-ispolnenii-ex/>
12. <https://www.selectscience.net/products/ependorf-new-brunswick-bioflo-310/?prodID=195302>
13. <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-prigotovleniya-rastvorov-s-donnoj-rotornoj-meshalkoj-i-parovoj-rubashkoj/>
14. [https://www.prombiofit.com/Equipment/upes\\_lab.html](https://www.prombiofit.com/Equipment/upes_lab.html)
15. <https://promvit.com.ua/reaktor-rsg-200-dlya-peremeshivaniya-zhidkosti-obemom-200-l/>
16. <https://biotechno.ru/catalog/filtryushchie-tsentrifugi/pilotnye-filtryushchie-tsentrifugi-cepta-tzz/>
17. <https://perryvidex.eu/product/150-ltr-3-bar-int-3-bar-jkt-agit-u2040-2>
18. <https://flexmash.com/uk/vagovij-dozator-flexwx/>
19. <https://prom.ua/ua/p1210706958-rotornyj-isparitel-52100a.html>
20. [https://chemtest.com.ua/ua/drobilka\\_shchekovaja\\_laboratornaja\\_vibrotexnik\\_shchd\\_6m\\_ua](https://chemtest.com.ua/ua/drobilka_shchekovaja_laboratornaja_vibrotexnik_shchd_6m_ua)
21. <http://www.taurasfenix.com/manufacture/by-type-auto/gorizontalnye-upakovochnye-avtomaty/linepak-f/>
22. <https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-direct-300-l-steam-heating-jacketed-reactor-62057500893.html?spm=a2700.8699010.29.22.58fc317f9sLnUF>

## РОЗДІЛ 5.2 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та культивування).

Креслення технологічної схеми (дод. 2) зроблене на аркуші формату А2, де зображені допоміжні роботи та технологічний процес.

Технологічну схему біосинтезу ПАР наведено у графічній частині курсової роботи.

### **ДР 1. Підготовка аераційного повітря**

#### ***ДР 1.1. Забір атмосферного повітря***

Коли визначають місце забору атмосферного повітря необхідно врахувати вже існуючі та можливі джерела газоподібних забруднень (автотранспорт, димарі, газоподібні промислові викиди та інші різні фактори). Враховуючи висоту будівлі підприємства (близько 13 м), забір атмосферного повітря відбуватиметься на висоті близько 2–4 м над будівлею, тобто 15 м. Забір повітря здійснюється за допомогою повітрозбірника (ПЗ – 1).

#### ***ДР 1.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок***

Під час даної стадії з повітря видаляють основну масу грубих механічних часточок, пилу та забруднювачів. Для цього використовуються фільтри грубої очистки (Ф-2). Ступінь очищення яких складає близько 90 %.

#### ***ДР 1.3. Стиснення повітря***

Стискування повітря відбувається за допомогою турбокомпресора (К-3) повітря стискають до 0,35–0,5 МПа, при цьому відбувається нагрів повітря до 120–250 °С.

#### ***ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи***

Для запобігання випадання вологи в краплєвловлювачі, повітря різко охолоджують до 25°C в теплообміннику (Т-4). Далі воно надходить у ресивер (Р-5), де відбувається процес стабілізації вологості повітря  $W = 60$  %.

#### ***ДР 1.5. Стабілізація термодинамічних показників***

Наступним етапом є підігрівання повітря у теплообміннику (Т-6) для того, щоб забезпечити коректну роботу фільтрів до температури 45-50°C. За таких температур конденсація пари не відбувається на волокнах фільтра.

#### ***ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі***

Наступне більш тонке очищення повітря відбувається у фільтрі (Ф-7), в якому як фільтрувальний матеріал використовують поліпропіленові волокна. Застосування даного матеріалу дає змогу отримати повітря з ступінем очистки  $E = 95$  %.

#### ***ДР 1.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі***

Кінцевою стадією очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (ФІ-14),(ФІ-16). Як фільтрувальний матеріал застосовується сополімер стирола. Ступінь очищення становить  $E=99,999$  %. Після чого стерильне аераційне повітря надходить на інші стадії виробничого процесу.

### ***ДР 2. Приготування титрувальних розчинів.***

#### ***ДР 2.1 Приготування 6% розчину HCl***

***ДР 2.1.1 Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживного середовища в інокуляторі та ферментері об'ємом 250л.***

Для приготування такого розчину необхідно в збірник об'ємом 2 л додати 1,28 л дистильованої води і при перемішуванні внести 320 мл 37% хлоридної кислоти.

#### *ДР 2.2 Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH*

*ДР 2.2.1 Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення середовища в інокуляторі та ферментері об'ємом 250 л.*

Для приготування такого розчину необхідно зважити 96 г NaOH і помістити в збірник об'ємом 2 л, після чого додають 1,6 л дистильованої води. Після того як NaOH розчиниться, стерилізують при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

#### *ДР 3.1. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів*

На технічних вагах в попередньо відтарованому стакані зважують (мг):  
140 – гептагідрату сульфату цинку, 100 – пентагідрату сульфату купруму,  
100 – моногідрату сульфату марганцю, 52 – борної кислоти, 12 – дигідрат молібдату натрію, Наважки мікроелементів вносять в колбу об'ємом 500 мл та розчиняють у 200 мл питної води.

Стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C та тиску 0,15 МПа, 40 хв та зберігають у стерильних умовах, і вносять до інших елементів поживного середовища стерильно в кількості 1 мл.

#### *ДР 4. Приготування і стерилізація поживного середовища.*

*ДР 4.1 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах.*

На цьому етапі необхідно приготувати 1,35 л поживного середовища, вміст компонентів для приготування наведений в табл 4.1

Таблиця 5.2

**Вміст компонентів середовища, які необхідні для приготування 1,35 л поживного середовища.**

<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Вміст компонентів у 1,35 л, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, мл</b>
NaNO <sub>3</sub>	2	2,7	А	800
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9	1,22		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7	0,945		
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,4	0,54	Б	550
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,1	0,135		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,001	0,0014		

*ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А.*

На технічних вагах зважують: 2,7 г NaNO<sub>3</sub> , 1,22 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> та 0,945 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> після цього наважки переносять в колбу об'ємом 2 л. В колбу додають 800 мл дистильованої води і перемішують до розчинення. Потім колбу закривають ватно-марлевою пробкою і композицію стерилізують в автоклаві при 131°C за тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

*ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б.*

Для приготування цієї композиції на технічних вагах зважують 0,54 г  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,135 г  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  та 0,0014 г  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  і поміщають в колбу об'ємом 1 л. Потім вносять 550 мл дистильованої води. Перемішують до розчинення солі, після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

***ДР 4.2 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л.***

На цьому етапі необхідно приготувати 13,5 л поживного середовища для вирощування інокуляту. Оскільки об'єм середовища на даному етапі складає 13,5 л, необхідно враховувати, що для біоситезу необхідно буде додати гліцерин у кількості 2% об/об, 10% припадає на посівний матеріал, тобто 1,35 л і ще 10% припадає на конденсат, який буде утворений під час стерилізації.

*Таблиця 5.3*

**Вміст компонентів середовища, які необхідні для приготування 13,5 л поживного середовища.**

<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Концентрація, г/л</b>	<b>Вміст компонентів у 13,5 л, г</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
$NaNO_3$	2	27	А	10,53
$Na_2HPO_4$	0,9	12,2		
$KH_2PO_4$	0,7	9,45		
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,4	5,4		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1	1,35		

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,001	0,0135		
---------------------------------------	-------	--------	--	--

*ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А.*

На технічних вагах зважують: 27 г NaNO<sub>3</sub> , 12,2 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 9,45 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 5,4 г MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 1,35 г CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O та 0,0135 г FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O після цього наважки переносять в збірник (Р-8) об'ємом 12 л. В збірник додають 10,53 л питної води та додають 6% розчин НСІ для запобігання осаду солей для кращого перемішування вмикають мішалку з частотою обертів 50 – 100 об/хв. Після розчинення компонентів композиції, їх передають у інокулятор (І-13) , де стерилізують при 131°С за тиску 0,15 МПа протягом 30 хв.

*ДР 4.3 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 250 л.*

На цьому етапі необхідно приготувати 135 л поживного середовища для вирощування інокуляту. Оскільки об'єм середовища на даному етапі складає 135 л, необхідно враховувати, що для біоситезу необхідно буде додати гліцерин у кількості 2% об/об, 10% припадає на посівний матеріал, тобто 13,5 л і ще 10% припадає на конденсат, який буде утворений під час стерилізації, об'єм якого складає 13,5 л. Вміст компонентів середовища для приготування 135 л поживного середовища наведено в табл.5. 4.

*Таблиця 5.4*

**Вміст компонентів середовища, які необхідні для приготування 135 л поживного середовища.**

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 135 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
NaNO <sub>3</sub>	2	270	А	105,3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9	122		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7	94,5		
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,4	54		
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,1	13,5		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,001	0,135		

#### *ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А.*

Через об'ємно - ваговий дозатор (Д-9) в збірник (Р-10) об'ємом 120 л вносять: 270 г NaNO<sub>3</sub> , 122 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 94,5 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 54 г MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 13,5 г CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O та 0,135 г FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O . В збірник додають 105,3 л питної води та додають 6% розчин HCl для запобігання осаду солей для кращого перемішування вмикають мішалку з частотою обертів 50 – 100 об/хв. Після розчинення компонентів композиції, їх передають на ферментер (ФР-12), де стерилізують при 131°C за тиску 0,15 МПа протягом 30 хв.

### **ТП 5. Підготовка посівного матеріалу**

#### ***ТП 5.1. Підтримання колекційної культури.***

Колекційна культура *Pseudomonas aeruginosa* W10 зберігається в пробірках з поживним бульйоном (NB). [16] Згідно цього для збереження колекційної культури її пересівають кожні 2-3 місяці.

### **ТП 5.2. Одержання робочої культури.**

Колекційну культуру з поживного бульйону (NB) за допомогою мікробіологічної петлі розсіюють на чашки Петрі з поживним агаром (NA) . Вирощують даний штам протягом 1 доби за температури 37°C до утворення ізольованих колоній. Після цього ізольовані колонії за допомогою мікробіологічної петлі переносять в холодильник де зберігають за температури 4°C . Лише одна колонія буде використовуватись для засіву однієї пробірки. Тривалість вирощування на даному етапі складає 1 добу.

### **ТП 5.3 Вирощування культури в колбах**

В колбу з композицією А (від ДР 4.1.1) вносять композицію Б (від ДР 4.1.2) після чого додають гліцерин у кількості 2% об/об, оскільки він не потребує стерилізації та запасний розчин мікроелементів (від ДР 3.1 ) після чого поживне середовище передають на наступний етап.

Далі поживне середовище розливають в 10 качалочних колб по 135 мл колби об'ємом 750 мл. Після в пробірку з робочою культурою *Pseudomonas aeruginosa* W10, яка вирощена на поживному агарі (NA) , вносять 5 мл стерильної водопровідної води, суспендують клітини після чого стерильною піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять в колбу з поживним середовищем (1 пробірка з робочою культурою на одну качалочну колбу). Всі проведені операції будуть проведені в асептичних умовах.

Культивують *Pseudomonas aeruginosa* W10 в колбах на качалках при 180 об/хв за температури 37°C протягом 24 годин. Після закінчення культивування обов'язково проводять мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси. Після закінчення проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал переміщують в стерильну засівну колбу.

### **ТП 5.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 25 л.**

У попередньо простерилізований інокулятор (І-13 ), і попередньо там простерилізовану композицію А (від ДР 4.2.1), вносять запасний розчин мікроелементів (від ДР 3.1 ) та додають гліцерин у кількості 2% об/об, вмикають перемішуючий пристрій і перемішують упродовж 5 хв. Після перемішування через засівну колбу вносять 1,35 л інокуляту (від ТП 5.3). Вирощування культури на даному етапі проходить за температури 37 °С протягом 24 год з перемішуванням 150 об/хв. Для мікробіологічного контролю з інокулятора кожні 6 години відбирають пробу культуральної рідини.

## ***ТП 6 Виробничий біосинтез***

### ***ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 250 л***

В посівний апарат спочатку вносять композицію А (від ДР 4.3.1), після чого стерилізують посівний апарат разом з цією композицією , далі в асептичних умовах вносять запасний розчин мікроелементів (від ДР 3.1 ) та додають гліцерин у кількості 2% об/об зі збірника (Р-12). Системою трубопроводів з дотриманням умов асептики подають посівний матеріал об'ємом 13,5 з інокулятору (І-13) (від ТП 5.4) ) у ферментер (ФР- 15) за допомогою труби перетискання.

У апарат подаєть повітря, аерація становить 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища за 1 хв в ферментері, швидкість перемішування - 180 об/хв Температуру регулюють подачею в рубашку апарату холодної води або насиченої пари, рН регулюють подачею стерильного 2 М NaOH або 6% розчином HCl .

Після цього проходить культивування протягом 120 год за температури при 37 ° С та при підтриманні рН на рівні 6,6-7,2. Культивування буде проводитися протягом наведеного вище часу до накопичення необхідної кількості цільового продукту (9,7 г/л). Після закінчення біосинтезу культуральна рідина передається на зберігання до збірника (З-18).

## **ТП 7 .Відділення біомаси**

### **ТП 7.1. Зберігання культуральної рідини**

Культуральну рідину зберігають у збірнику (З-18) при 4-8 °С для подальшого відділення та очищення рамноліпідів.

### **ТП 7.2. Центрифугування культуральної рідини**

Культуральна рідина, через насос (Н-19), подається до сепаруючої центрифуги (Ц-20). Вмикається режим 13000 об/хв на 15 хвилин. Отримана біомаса подається на знешкодження. Отриманий супернатант подається до реактора (Р-21) за допомогою труби перетискання.

## **ТП 8 Виділення рамноліпідів**

### **ТП 8.1. Кислотне осадження.**

Супернатант культуральної рідини у реакторі (Р-21) доводять до рН 3,0 ,10% розчином HCl, який подають через об'ємний дозатор (Д-22), при перемішуванні і нагріванні до 70 °С. Після чого отримана суспензія передається на екстракцію в реактор (Р-24) за допомогою відцентрового насоса (Н-23), а рідка фракція передається на знешкодження.

### **ТП 8.2. Потрійна екстракція**

Отримана суспензія з реактора (Р-21) передається у реактор (Р-24), де її обробляють з використанням рівного обсягу (об / об) етилацетату, який подається через об'ємно-ваговий дозатор (Д-25) та перемішують впродовж 3 год для ефективного протікання процесу екстракції. Після проведення першої екстракції одержану суспензію передають за допомогою відцентрового насоса (Н-26) у реактор (Р-27) де повторюють процес екстракції за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-28) після чого суспензію передають за допомогою відцентрового насоса (Н-29) у реактор (Р-30) , де екстракція повторюється втретє, за допомогою об'ємно-вагового дозатора

(Д-31). Після проведення третьої екстракції суспензію передають роторну сушарку (РВ-32)

### **ТП 8.3. Сушіння**

Отриманий органічний екстракт, що містить рамноліпіди, переносять у роторну сушарку (РВ-32). Після чого проводить сушіння при 50 ° С та при абсолютному тиску 0.4 атм до постійної маси медового кольору, потім висушену масу з РВ-32 подають на подрібнення в дробарку (ДР-33).

### **ТП 8.4. Подрібнення**

Після сушіння сировину з роторної сушарки (РВ-32) поміщають у шокерну дробарку ЩД 6М (ДР-33) та подрібнюють матеріал з розміром щілини 2 мм після чого готовий подрібнений порошок передають передається на стадію ПМВ.

### **ПМВ 9. Пакування, маркування та відвантаження.**

Отриманий порошок розсипається в підготовлені металізовані пакети за допомогою фасувальної машини (ФМ-34), вагою 100 г, після чого готову продукцію відправляють на склад.

### **ЗВ 10. Знешкодження відходів**

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

#### ***ЗВ 10.1. Знешкодження газоподібних відходів***

Очищення викидів з ферментерів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням газів, зниженням вологості в вологовідбійниках з подальшим нагріванням, щоб уникнути потрапляння крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення повітря, що входить в вентиляційну систему, використовують різноманітні фільтри з волокнистих матеріалів.

Очищене повітря викидається через трубу розсіювання

### **ЗВ 10.2. Знешкодження рідких відходів**

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують в каналізацію.

## **РОЗДІЛ 5.3. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА**

### **5.3.1. Мікробіологічний контроль.**

Культивування *Pseudomonas aeruginosa* W10 для ожержання рамноліпідів повинно проходити в асептичних умовах[67], а тому необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб запевнитись у відсутності контамінації. Для цього кожні 4 год з посівного апарату об'ємом 25 відбираються зразки культуральної рідини та кожні 6 год відбираються зразки з ферментера об'ємом 250 л для аналізу.

Культуральну рідину розсівають за допомогою петлі до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соевим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів і грибів. *P. aeruginosa* на щільних поживних середовищах формує колонії інтенсивного жовтого кольору, які через 48 годин стають коричневими в'язкими. Росте при 37 °С та при рН на рівні 6,6-7,2 [74 ] (мал. 6.1)



Мал 5.1 *P. aeruginosa* на щільному середовищі з агаром

### 5.3.2. Мікроскопіювання

Для проведення даного етапу контролю використовують препарат «роздавлена крапля». Приготування препаратів здійснюється за методом роздавленої краплі, а саме: на поверхню сухого чистого предметного скла вносять одну краплю води або фізіологічного розчину в разі, якщо здійснюється перевірка посівного матеріалу, на наявність контамінантів. Бактеріологічною петлею в краплю вносять невелику кількість культури, котру досліджують і обережно розподіляють її в товщі рідини після чого отримаємо однорідну суспензію. У випадку якщо будемо здійснювати перевірку культуральної рідини на наявність сторонньої мікрофлори, то на поверхню чистого сухого предметного скельця буде вноситись лише декілька крапель культуральної рідини. Потім підготовлену раніше краплю накривають покривним склом обережно, щоб уникнути утворення майже непомітних бульбашок повітря. У вадку якщо частина рідини виливається за край покривного скла, надлишок даного середовища можна прибрати

вузькою смужкою фільтр-паперу. Готові препарати розглядають в сухих та іммерсійних системах[97].

За умови відсутності у зразку сторонньої мікрофлори під час мікроскопіювання можна побачити прямі палички, розташовані поодинокі, попарно або у вигляді коротких ланцюжків розмірами 1-5 x 0,5-1,0 мікрон, [74].

### **5.3.3. Визначення концентрації біомаси.**

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, потім вимірюють оптичну густину (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком[98].

### **5.3.4. Визначення концентрації джерела вуглецю(гліцерину)**

Цей метод визначає гліцерин та інші поліспирти, що містять три або більше суміжних гідроксильних груп. Гліцерин реагує з перйодатом натрію в розчині кислоти, утворюючи альдегіди та мурашину кислоту. Останнє є мірою вмісту гліцерину у зразку. Метод перйодату натрію замінює метод ацетину та метод дихромату, оскільки було встановлено, що він є більш точним і більш конкретним для визначення гліцерину, а також є більш простим і швидким. Застосовується до будь-якого розчину гліцерину, але особливо корисний при аналізі зразків, що містять окислювані органічні домішки та певні гідроксильовані сполуки, які перешкоджають процедурам дихромату та ацетину. Для визначення кількості гліцерину 1 мл культуральної рідини центрифугували при 8000 об / хв протягом 15 хв,

безклітинний супернатантний шар збирали і промивали 3 об'ємами 5 мл н-гексану для видалення залишкової олії. Водну фазу розчиняли до 50 мл у мірній колбі. Розчин переносили в конічну колбу об'ємом 250 мл, а вміст вільного гліцерину визначали методом окислення періодата натрію згідно з методом American Oil Chemists' Society Ea 6-51. [99].

### **5.3.5. Визначення концентрації цільового продукту(рамноліпідів).**

Визначення концентрації рамноліпідів. Для визначення кількості рамноліпідів у культуральній рідині використовували орциновий метод із застосуванням спектрофотометра UVmini – 1240 (“Shimadzu”, Japan). Рамноліпід з 5 см<sup>3</sup> супернатанту КР екстрагували двічі з використанням 5 см<sup>3</sup> суміші Фолча (хлороформ : метанол – 2:1). Після випарювання органічної фази під вакуумом екстракт ліпідів розчиняли в дистильованій воді. 1 см<sup>3</sup> розчину швидко перемішували з 5 см<sup>3</sup> орцинового реактиву (0,2 г орцину у 100 см<sup>3</sup> концентрованої сірчаної кислоти) при охолодженні, витримували 15 хв на водяній бані за температури 90 °С і вимірювали оптичну густина на довжині хвилі 420 нм. Калібрувальний графік будували за рамнозою як стандартом. [100].



Мал. 5.2 Спектрофотометр UVmini – 1240 (“Shimadzu”, Японія)

### 5.3.6. Визначення вологості

Контроль вологості готового продукту проводять за допомогою аналізатора вологості MA 50/X — це сучасний лабораторний вимірювальний прилад який призначений для визначення відносної вологості і сухого залишку будь-яких сипучих і рідких продуктів.

За допомогою пропонованого *аналізатора вологості* провести необхідні вимірювання набагато простіше і швидше — всього за 5-20 хвилин можна отримати готові результати. Нагадаємо: при способі визначення вологості були потрібні сушильна шафа, ваги і набагато більше часу. У конструкції *аналізатора вологості MA 50/X* закладена можливість для підключення персонального комп'ютера, принтера КАФКА і клавіатури, а це, ясна річ, спрощує введення параметрів сушіння.

Бібліотека програми дозволяє користувачеві запрограмувати в прилад

до 99 -ти власних унікальних програм сушіння. Для роботи системи необхідно буде тільки вибрати назву потрібного продукту, а не вводити кожен раз всі параметри сушки.

У бібліотеці пам'яті аналізатора вологості МА 50/Х зберігаються дані про останні 99 вимірах. Ці дані включають дату і час вимірювання, назва продукту, час сушіння, стартову та кінцеву масу, температуру і профіль сушки, результат (вміст вологи).

Загалом, аналізатор вологості МА 50/Х — це дуже зручний, практичний і, повторимося, сучасний прилад, який робить процес визначення вологості швидким і нескладним [102].

### **5.3.7. Ідентифікація активної діючої речовини.**

Визначення ПАР у ґрунтується на екстракції хлороформом іонних ПАР з барвником метиленовим синім та обчисленні концентрації аніонних поверхнево-активних речовин за допомогою градуювального графіку. Методика визначення з барвником метиленовим синім: в ділільну лійку (50 см<sup>3</sup>) вносять 10 см<sup>3</sup> буферного розчину з рН 11, 5 см<sup>3</sup> метиленового синього, натрію додецилсульфату (1см<sup>3</sup> , 2...30 см<sup>3</sup> ) і 15 см<sup>3</sup> хлороформу і екстрагують протягом 1 хв. Екстракти зливають в колбу, хлороформом доводять до позначки і перемішують. Дослідження повторюють три рази і використовують середні значення оптичної густини. За результатами вимірювань побудовані градуювальні графіки з метиленовим синім. [101].

### **5.3.8. Антибіоплівкова активність (ступінь деструкції біоплівки).**

Формування та інгібування біоплівки на поверхні нержавіючої сталі (2 см 2) проводили в 6-лункових планшетах (Nunc™, Thermofisher) із використанням середовища NB за наявності 2% глюкози. Спочатку формування біоплівки оцінювали через різні часові інтервали 24, 48 та 72 год для трьох штамів на поверхні стерилізованої нержавіючої сталі, використовуючи оптичну щільність та формування колоній (КОЕ). Для інгібування біоплівки на сталі було обрано оптимальне формування біоплівки через 48 год для дослідження ефективності поверхнево-активних речовин. Культури, вирощені протягом 12 год, що містять *B. licheniformis*, *S. capitis*, *P. aeruginosa* ( $5 \times 10^6$  CFU/ml), а також змішану культуру даних штамів у рівних співвідношеннях (1: 1: 1) інокулювали в 5 мл середовища NB, що містило три концентрації досліджуваного рамноліпиду (0,1, 0,5 та 1 мг/мл). Поверхні з нержавіючої сталі без обробки служили контролем. Сталеві поверхні видаляли, промивали 2 мл стерильним розчином PBS в 30-міліметрових стерильних універсальних пробірках і енергійно струшували протягом 1 хв. Одиниці утворення колонії бактерій на площу поверхні (см КУО<sup>-2</sup>) було визначено і виражено як log (КУО см<sup>-2</sup>). Визначення проводили у трьох повторях (n = 3). [101].

### 5.3.9 Карта контролю

Таблиця 5.5

Карта постадійного контролю виробництва рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* W10

Номер контрольної точки та 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
Кт 1.1. Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Альтиметр	При проектуванні приміщень	h = 20 м
Кт 1.2. Грубе очищення повітря від пилу та часток	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35–0,5 МПа, t = 120–150 °C
Кт 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, після видалення зайвої вологи температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 25 °C, W = 60 %
Кт 1.5. Стабілізація термодинамічних показників	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 45- 50 °C
Кт 1.6. Очищення повітря в головному	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення,	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту	Після очистки повітря у головного фільтра	E = 95 %,

фільтри	перепад тисків	фільтра		тиск згідно паспорту
---------	----------------	---------	--	----------------------

Продовження табл. 5.5

1	2	3	4	5
Кт 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	E = 99,99 %, тиск згідно паспорту
Кх, К <sub>т</sub> .2.1.1 Приготування розчину HCl	Концентрація, показники дозаторів	Дозатори	До початку процесу	V=2л C=6%
Кх, К <sub>т</sub> .2.2.1 Приготування розчину NaOH	Концентрація, показники дозаторів	Дозатори	До початку процесу	V=2л C=6%
Кх, Кт, Км 3.1. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів	Розчин мікроелементів, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А у колбах	Композиція А, та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б у колбах	Композиція Б, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв,

				відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 25 л	Композиція А, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 5.5

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л	Композиція А, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Культура <i>P. aeruginosa</i> W10, тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль у процесі збереження	t = 4 °С, τ = 3-4 міс, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2. Одержання робочої	Культура <i>P. aeruginosa</i> W10,, тривалість культивування, температура,	Датчик температури, годинник, мікробіологічний	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний	t = 37 °С, τ = 24 год,

культури	мікробіологічна чистота	контроль	контроль після культивування	відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.3. Вирощування інокуляту в колбах	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота.	Термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Контролюється частота обертів перемішуючого пристрою, температура – безперервно, мікробіологічний контроль проводиться після вирощування	t = 37°C, n = 180 об/хв, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти,

Продовження табл. 5.5

Кх, Кт, Км 5.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 25 л	Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 години	t = 37°C, n = 150 об/хв, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти,
Кх, Кт, Км 6.1.	Культуральна рідина, рН, температура, тривалість	Датчик рН та температури, тахометр,	рН визначається перед та в процесі культивування,	рН = 6,6-7,2

Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 250 л	культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	годинник, мікробіологічний контроль, ваговий метод	температура визначається безперервно під час культивування. Визначається витрати стерильного аераційного повітря. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, концентрації біомаси відбираються кожні 6 години	$t = 37^{\circ}\text{C}$ , $n = 180$ об/хв, $\tau = 120$ год, $C_{\text{п}} = 9,7\text{г/л}$ , відсутність сторонньої мікробіоти,
Кт, Кх 7.1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина, температура	Термометр	Під час зберігання КР	$t = 4-8^{\circ}\text{C}$
Кт 7.2. Центрифугування	Культуральна рідина, біомаса, супернатант, час, кількість обертів.	Датчик обертів, годинник.	Під час центрифугування	$n=13000$ об/хв, $\tau = 15\text{хв}$
Кт, Кх 8.1 Кислотне осадження	Супернатант, температура, частота обертання, час обертання, час осадження	Термометр, годинник, рН-метр,	Весь час осадження	рН-3 $t = 70^{\circ}\text{C}$
Кт, Кх 8.2 Екстракція	Осад, температура, час.	Термометр, годинник, рН-метр, датчик обертів	Весь час процесу	$\tau = 180\text{хв}$ $n = 120$ об/хв,
Кт, Кх 8.3 Сушіння	Колір продукту. температура	Термометр, аналізатор вологості	Весь час процесу	$t = 40^{\circ}\text{C}$ $W = 5\%$

КТ 8.4 Подрібнення	Розмір подрібнених частинок	Сито	Після закінчення процесу	d= 2 мм
--------------------	-----------------------------	------	--------------------------	---------

## ВИСНОВКИ

Нині актуальним залишається пошук безпечних та ефективних сполук, які б перешкождали адгезії мікроорганізмів до поверхонь або ж руйнували вже існуючої біоплівки на різноманітних поверхнях. Серед усіх інфекційних захворювань близько 65—70% спричиняються бактеріями, які формують біоплівки на поверхні медичного обладнання або харчової промисловості.

На основі наведених даних, розраховано річну потребу в препараті для України та вирахована необхідна кількість діючої речовини, яку будуть одержувати біотехнологічним шляхом.

Як основний продуцент обрано штам *Pseudomonas . aeruginosa* W10 оскільки він є більш дешевим серед інших в біосинтезі та синтезує на МСМ доповненим гліцерином 9,7 г/л цільового продукту.

Як товарну форму обрано порошок за дешевизну та відносну простоту виробництва, що надає переваги перед іншими товарними формами. Випуск передбачає використання металізованих пакетів, в яких буде розміщено по 100г порошку.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2017, 9(1): 522–554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372
2. Tan, S. Y.-E., Chew, S. C., Tan, S. Y.-Y., Givskov, M., & Yang, L.. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 26: 1–6. doi:10.1016/j.copbio.2013.08.002
3. Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Song, Z., Нøiby, N., Molin, S., & Givskov, M.. Combating biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2015,65(2):146–157. doi:10.1111/j.1574-695x.2011.00858.
4. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. СТРАТЕГИЯ УПРАВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫМ БИОПЛЕНОЧНЫМ ПРОЦЕССОМ. *Журнал инфектологии*. 2012, 4(3):5-15. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2012-4-3-5-15>
5. Smirnova T.A., Didenko L.V., Romanova Y.M., Azizbekyan R.R. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BACTERIAL BIOFILMS *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2010, 79(4): 413-423.
6. Donlan, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002,8(9): 881–890. doi:10.3201/eid0809.020063
7. Гостев В.В., Сидоренко С.В. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ И ИНФЕКЦИИ. *Журнал инфектологии*. 2010,2(3):4-15. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15>
8. Khan, Diversity of bacteria and bacterial products as antibiofilm and anti-quorum sensing drugs against pathogenic bacteria, *Curr Drug Targets*. 2019, 20 (11): 1156-1179 .doi:10.2174/1389450120666190423161249

9. Афиногенова А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3(61). – С. 119-125.
10. Рыбальченко, О.В. Ультраструктура микробных биопленок при межклеточных взаимоотношениях бактерий в сообществах / О.В. Рыбальченко, В.М. Бондаренко, О.Г. Орлова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2014. – № 4. – С. 87-92.
11. Kaplan, J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses / J.B. Kaplan // J. Dent. Res. – 2010. – V. 89, № 3. – P. 205–218.
12. Маянский, А.Н. Pseudomonas aeruginosa: характеристика биопленочного процесса / А.Н. Маянский [и др.] // Мол. ген. микробиол. вирусол. – 2012. – № 1. – С. 1–6.
13. Hojby N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hojby [et al.] // Intern. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – V. 35, № 4. – P. 322–332.
14. Brackman, G. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo / G. Brackman [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2011. – V. 55, № 6. – P. 2655–2661.
15. Fuxman Bass, J.I. Extracellular DNA: a major proinflammatory component of Pseudomonas aeruginosa biofilms / J.I. Fuxman Bass [et al.] // J. Immunol. – 2010. – V. 184, № 11. – P. 6386–6395
16. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. – 2011. – № 3. – С. 99–109.
17. Ma, L. Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix / L. Ma [et al.] // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5, № 3. – P. e1000354.
18. Степанова, Т.В. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых

- Pseudomonas auruginosa* и *Burkholderia cenocepacia* / Т.В. Степанова [и др.] // Мед. алфавит. Лаборатория. – 2010. – № 1. – С. 47–51.
19. Marti, M. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus* / M. Marti [et al.] // *Microbes Infect.* – 2010. – V. 12, № 1. – P. 55–64.
20. Zhao, T. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas auruginosa* / T. Zhao, Y. Liu // *BMC Microbiol.* – 2010. – V. 10. – P. 140–148.
21. Tetz, G.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics / G.V. Tetz, N.K. Artemenko, V.V. Tetz // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – V. 53, № 3. – P. 1204–1209
22. Storz, G. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers / G. Storz, J. Vogel, K.M. Wassarman // *Mol. Cell.* – 2011. – V. 43, № 6. – P. 880–891.
23. Kandarp Bhatt, Sangeeta Lal Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase. *Int J Biol Macromol.* 2020,164:3332-3339. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.205.
24. Field, D., Gaudin, N., Lyons, F., O'Connor, P. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P.. A Bioengineered Nisin Derivative to Control Biofilms of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLOS ONE.* 2015, 10(3), doi:10.1371/journal.pone.0119684
25. Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., & van der Donk, W. A. Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. *Chemical Reviews.* 2005, 105(2), 633–684. doi:10.1021/cr030105v
26. Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry.* 2015, 7(5): 647–671. doi:10.4155/fmc.15.7
27. Pat. 5494816 USA ENHANCED INDOLE BIOSYNTHESIS/Douglas C. Murdock Publ.27.02.96

28. Angelopoulou, A., Field, D., Pérez-Ibarreche, M., Warda, A. K., Hill, C., & Ross, R. P. Vancomycin and nisin A are effective against biofilms of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human milk. *PLOS ONE*. 2020, 15(5). doi:10.1371/journal.pone.0233284
29. Süssmuth, R. D., Pelzer, S., Nicholson, G., Walk, T., Wohlleben, W., & Jung, G. New Advances in the Biosynthesis of Glycopeptide Antibiotics of the Vancomycin Type from *Amycolatopsis mediterranei*. *Angewandte Chemie International Edition*. 1999, 38:13-14 . doi:10.1002/(sici)1521-3773(19990712)38:13/14<1976::aid-anie1976>3.0.co;2-3
30. Jung, H.-M., Kim, S.-Y., Moon, H.-J., Oh, D.-K., & Lee, J.-K. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 77(4): 789–795. doi:10.1007/s00253-007-1221-4
31. Rendueles, O., Kaplan, J. B., & Ghigo, J.-M. *Antibiofilm polysaccharides*. *Environmental Microbiology*. 2012,15(2): 334–346. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x
32. Wu, S., Liu, G., Jin, W., Xiu, P., & Sun, C. Antibiofilm and Anti-Infection of a Marine Bacterial Exopolysaccharide Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2016,7. doi:10.3389/fmicb.2016.00102
33. Roca, C., Lehmann, M., Torres, C. A. V., Baptista, S., Gaudêncio, S. P., Freitas, F., & Reis, M. A. M. Exopolysaccharide production by a marine *Pseudoalteromonas sp.* strain isolated from Madeira Archipelago ocean sediments. *New Biotechnology*. 2016, 33(4): 460–466. doi:10.1016/j.nbt.2016.02.005
34. Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., & Yu, W. Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from Marine Bacterium *Vibrio sp. QY101*. *PLoS ONE*. 2011, 6(4). doi:10.1371/journal.pone.0018514
35. Guo, S., Mao, W., Han, Y., Zhang, X., Yang, C., Chen, Y., ... Xu, J. Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiella tarda*.

- Bioresource Technology*. 2010, 101(12): 4729–4732. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.125
36. Brian-Jaisson, F., Molmeret, M., Fahs, A., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Blache, Y., Ortalo-Magné, A. Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances produced by the marine biofilm-forming bacterium *P. ulvae* strain TC14. *Biofouling*. 2016, 32(5): 547–560. doi:10.1080/08927014.2016.1164845
37. [Xiaoqing Xu](#), [Qing Peng](#), [Yuwei Zhang](#). A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties *in vitro*. *Food Nutr Res*. 2020, 64: 10. doi: [10.29219/fnr.v64.3744](https://doi.org/10.29219/fnr.v64.3744)
38. Bendaoud, M., Vinogradov, E., Balashova, N. V., Kadouri, D. E., Kachlany, S. C., & Kaplan, J. B. Broad-Spectrum Biofilm Inhibition by *Kingella kingae* Exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*. 2011, 193(15): 3879–3886. doi:10.1128/jb.00311-11
39. Li, X.-H., & Lee, J.-H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. *Journal of Microbiology*. 2017, 55(10): 753–766. doi:10.1007/s12275-017-7274-x
40. Nguyen, U. T., & Burrows, L. L. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, 187: 26–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025
41. Oloketuyi, S. F., & Khan, F. *Inhibition strategies of Listeria monocytogenes biofilms-current knowledge and future outlooks*. *Journal of Basic Microbiology*. 2017, 57(9), 728–743. doi:10.1002/jobm.201700071
42. [A Boyd](#), [A M Chakrabarty](#). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* .1994, 60(7): 2355–2359 doi: 10.1128/AEM.60.7.2355-2359.1994.
43. Daboor, S. M., Raudonis, R., Cohen, A., Rohde, J. R., & Cheng, Z. Marine Bacteria, A Source for Alginolytic Enzyme to Disrupt *Pseudomonas*

- aeruginosa* Biofilms. *Marine Drugs*. 2019, 17(5): 307. doi:10.3390/md17050307
44. Banar, M., Emaneini, M., Beigverdi, R., Fanaei Pirlar, R., Node Farahani, N., van Leeuwen, W. B., & Jabalameli, F. *The efficacy of lyticase and  $\beta$ -glucosidase enzymes on biofilm degradation of Pseudomonas aeruginosa strains with different gene profiles*. *BMC Microbiology*. 2019, 19(1). doi:10.1186/s12866-019-1662-9
45. Lamppa, J. W., & Griswold, K. E. Alginate Lyase Exhibits Catalysis-Independent Biofilm Dispersion and Antibiotic Synergy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012, 57(1): 137–145. doi:10.1128/aac.01789-12
46. Sanaulla Farisa Banu, Subbiah Thamocharan, Marine bacterial DNase curtails virulence and disrupts biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *Biofouling*. 2019, 35 (9): 975-985. DOI: 10.1080 / 08927014.2019.1680650.
47. Oloketuyi, S. F., & Khan, F. *Strategies for Biofilm Inhibition and Virulence Attenuation of Foodborne Pathogen-Escherichia coli O157:H7*. *Current Microbiology*. 2017, 74(12), 1477–1489. doi:10.1007/s00284-017-1314-y
48. Lim, E. S., Koo, O. K., Kim, M.-J., & Kim, J.-S. Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite. *Scientific Reports*. 2019, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-46363-w
49. Tan, Y., Ma, S., Liu, C., Yu, W., & Han, F. Enhancing the stability and antibiofilm activity of DspB by immobilization on carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Microbiological Research*. 2015, 178: 35–41. doi:10.1016/j.micres.2015.06.001
50. Mishra, R., Panda, A. K., De Mandal, S., Shakeel, M., Bisht, S. S., & Khan, J. *Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens*. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.566325

51. Hogan, S., Zapotoczna, M., Stevens, N. T., Humphreys, H., O’Gara, J. P., & O’Neill, E. Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. *Journal of Hospital Infection*. 2017,96(2): 177–182. doi:10.1016/j.jhin.2017.02.008
52. Kandarp Bhatt, Sangeeta Lal Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase. *Int J Biol Macromol*. 2020,164:3332-3339. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.205.
53. PubMed [Электронный ресурс]//. – Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=anti+biofilm+biosurfactant&sort=date>
54. Sood, U., Singh, D. N., Hira, P., Lee, J.-K., Kalia, V. C., Lal, R., & Shakarad, M. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1. *Journal of Biotechnology*. 2019, 307: 98-106. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.11.004
55. Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., Banat, I. M. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of Basic Microbiology*. 2017, 57(5): 364–375. doi:10.1002/jobm.201600658
56. F. Hamza, S. Satpute, A. Banpurkar, A.R. Kumar, S. Zinjarde, Biosurfactant from a marine bacterium disrupts biofilms of pathogenic bacteria in a tropical aquaculture system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2017, 93 (11).<http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fix140>.
57. Hamza, F., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. Coculture induced improved production of biosurfactant by *Staphylococcus lentus* SZ2: Role in protecting *Artemia salina* against *Vibrio harveyi*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2018, 114, 33–39. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.03.008
58. Okoliegbe I.N. Application of microbial surfactant / I.N. Okoliegbe, O.O. Agarry // *Scholarly Journals of Biotechnology*. – 2012. – Vol.1 (1). – P. 5-6.

59. Пирог Т.П. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва / Т.П. Пирог, С.В. Ігнатенко // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 29-38.
60. Abdel-Mawgoud A.M. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate BS20 / A.M. Abdel-Mawgoud, M.M. Aboulwafa, N.A.H. Hassouna // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 329-345.
61. Ron E.Z. Natural role of biosurfactants / E.Z. Ron., E. Rozenberg // *Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 3. – P. 229-236.
62. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I. M. Banat, I. Franzetti, A. Gandol// *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2010. – Vol. 87. – P.427–444
63. ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ У СКЛАДІ ЛІКАРСЬКИХ ТА КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ І.Р.Пелех, С.Б.Білоус, Р.І.Вільданова, О.М. Шульга, 2016 , DOI: 10.11603 / 2312-0967.2016.1.6062
64. Commodity analysis of disinfectants in the pharmaceutical market of Ukraine. Commodity analysis of products of pharmacy assortment: materials IV scientific-practical. Ivko TI, Hermaniuk TA, Baranova II. Kharkiv; 2018.
65. Kasianenko, OI, Berezovskyi AV, Kasianenko SM, Dolbonosova RV. Analysis of the market of disinfectants in Ukraine. Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology. 2019;20(2): 439-450.
66. Заклади охорони здоров'я Електронний ресурс // Режим доступу: [https://ukrstat.org/uk/operativ/operativ2007/oz\\_rik/oz\\_u/zakladu\\_06\\_u.html](https://ukrstat.org/uk/operativ/operativ2007/oz_rik/oz_u/zakladu_06_u.html)
67. Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., ... Banat, I. M. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as

- antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of Basic Microbiology*, – 2017. - V.57(5), P.364-375. doi:10.1002/jobm.201600658
- 68.Методичні рекомендації - Загальні принципи використання та обробки ендоскопічної апаратури. Електронний ресурс // Режим доступу: <https://uadoc.zavantag.com/text/23452/index-1.html>
- 69.Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2017, 9(1): 522–554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372
- 70.Gudina, E. J., Rodrigues, A. I., Alves, E., Domingues, M. R., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R.. *Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation*. *Bioresource Technology*, - 2015. - 177, 87–93. doi:10.1016/j.biortech.2014. 1.069
- 71.Sood, U., Singh, D. N., Hira, P., Lee, J.-K., Kalia, V. C., Lal, R., & Shakarad, M. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1. *Journal of Biotechnology*. 2019 , 307: 98-106. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.11.004
- 72.Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., Бодров В.С., Запорожець Ю.В., Попова Н.В., Мисюра Т.Г. Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: Метод. рекомендації до вивчення дисципліни, виконання курсових і контрольних робіт для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Уклад.:. – К.: НУХТ, 2012. – 98 с.
- 73.Rhamnolipids—Next generation surfactants? / [M. M. Müller, J. H. Kügler, M. Henkel et al.]. // *Journal of Biotechnology*. – 2012. – No. 4. – P. 366–380
- 74.Jarvis F. G. A Glycolipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa* / F. G. Jarvis, M. J. Johnson. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1949. – No. 12. – P. 4124–4126.

75. Khan, Diversity of bacteria and bacterial products as antibiofilm and anti-quorum sensing drugs against pathogenic bacteria, *Curr Drug Targets*. 2019, 20 (11): 1156-1179 .doi:10.2174/1389450120666190423161249
76. Sood, U., Singh, D. N., Hira, P., Lee, J.-K., Kalia, V. C., Lal, R., & Shakarad, M. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1. *Journal of Biotechnology*. 2019, 307: 98-106. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.11.004
77. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant / [H. Abbasi, M. Hamedi, T. B. Tayebe Bagheri Lotfabad et al.]. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2012. – №2. – P. 211–219.
78. Okoliegbe I. N. Application of microbial surfactant / I. N. Okoliegbe, O. O. Agarry. // *Scholarly Journal of Biotechnology*. – 2012. – №1. – P. 15–23.
79. Ю.В. Карлаш. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013 – 143 с.
80. Глембоцкий В. А. Классен В. И. Флотация — М., 1973
81. Фільтруючі центрифуги СЕРА ТЗ [Електронний ресурс]// . – Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/filtruyushchie-tsentrifugi/pilotnye-filtruyushchie-tsentrifugi-сера-tz/>
82. Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: *Biosurfactants*. Berlin: Springer / [A. M. AbdelMawgoud, R. Hausmann, F. Lépine et al.]. // *Biosurfactants*. – 2011. – P. 13–55.
83. Patent US005656747A United States. Process for the quantitative purification of glycolipids/ Mixich et al. Date of Patent: Aug. 12, 1997.

84. Kumar P. Characterization of Biosurfactant from Bacillus Isolates as Antifungal Agent / P. Kumar, R. Sharma, A. Gajbhiye. // Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2015. – No. 2. – P. 117–123
85. Dziegielewska E. Evaluation of waste products in the synthesis of surfactants by yeasts / E. Dziegielewska, M. Adamczak. // Chemical Papers. – 2013. – No. 9. – P. 1113–1122.
86. Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., ... Banat, I. M. Rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. Journal of Basic Microbiology, – 2017. - V.57(5), P.364-375. doi:10.1002/jobm.201600658
87. Smyth, T. J. P., Perfumo, A., Marchant, R., & Banat\*, I. M. (2010). Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 3705–3723. doi:10.1007/978-3-540-77587-4\_291
88. Оптимізація процесу екстракції біосурфактантів, синтезованих бактеріями роду Rhodococcus / [Е. В. Карпенко, М. В. Прыстай, Р.Г.Макитра и др.] // Наукові праці Донецького Національного технічного університету. – 2011. – №17(187). – С. 124-128.
89. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens / [R. Y. Shax, L. F. Jiang, Q. Meng et al.]. // Journal of Basic Microbiology. – 2012. – P. 458–466.
90. Hammen S. Chemoenzymatische Modifikation von nativen und hydrolysierten Sophoroselipiden : 570 Biowissensc / Hammen Sabine – Braunschweig, 2003. – 160 P
91. Walter V. New Approaches for the Economic Production of Rhamnolipid Biosurfactants from Renewable Resources : 570 Biowissensc / Walter Vanessa – Karlsruhe, 2009. – 129 P
92. Конвективні сушарки. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://poznayka.org/s1542t1.html>

93. Розрахунок і принцип роботи розпилювальної сушарки. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://ua-referat.com/Розрахунок\\_і\\_принцип\\_роботи\\_розпилювальної\\_сушарки](http://ua-referat.com/Розрахунок_і_принцип_роботи_розпилювальної_сушарки)
94. Titan Techniks RE-52100F [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://kiev.prom.ua/ua/p1210706958-rotornyj-isparitel-52100a.html>
95. Abdel-Mawgoud A.M. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate BS20 / A.M. Abdel-Mawgoud, M.M. Aboulwafa, N.A.H. Hassouna // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 329-345.
96. Методичні рекомендації - Загальні принципи використання та обробки ендоскопічної апаратури. Електронний ресурс // Режим доступу: <https://uadoc.zavantag.com/text/23452/index-1.html>
97. Роздавлена крапля [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://ukrhealth.ru/rizne/49852-rozdavlena-%20%20kraplja.html>
98. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. / Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 217 с.
99. Wadekar S. D., Kale S. B., Lali A. M., Bhowmick D. N., Pratap A. P. Utilization Of Sweetwater As A Cost-Effective Carbon Source For Sophorolipids Production By *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2012, 42(2): 125–142. doi:10.1080/10826068.2011.577883.
100. Guerra-Santos L. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source / L. Guerra-Santos, O. Kappeli, A. Fiechter. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1984. – P. 301–305.
101. Державна Фармакопея України [Електронний ресурс]//. – Режим доступу: <https://docplayer.net/77551242-Derzhavna-farmakopeya-ukrayini.html>

102. Аналізатор вологості (Вологомір) Radwag MA 50X [Електронний ресурс]//. – Режим доступу: [http://chemtest.com.ua/ua/product\\_print.php?item\\_id=1851](http://chemtest.com.ua/ua/product_print.php?item_id=1851)