

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

**Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології**

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__»_____20__р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__»_____20__р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова,
харчова, природоохоронна»

на тему: «Біосинтез наночастинок срібла з використанням *Rhodotorula
mucilaginosa*»

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

Коваль Ростислав Віталійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Скороцька Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент _____
(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 – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

«01» березня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Коваля Ростислава Віталійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез наночастинок срібла з використанням *Rhodotorula mucilaginosa*»

керівник роботи Скороцька Оксана Ігорівна, доцент, к.б.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «03» 03 2023 року №164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05 червня 2023 року

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Rhodotorula mucilaginosa*; цільовий продукт: наночастинок срібла; геометричний об'єм ферментера: 30 л; коефіцієнт заповнення: 0,5

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва; специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; контроль виробництва; аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва; нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу наночастинок срібла - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу наночастинок срібла - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика наночастинок срібла</i>	<i>01.03.23-09.03.23</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору біологічного агента для біосинтезу наночастинок срібла</i>	<i>10.03.23-19.03.23</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>20.03.23-26.03.23</i>	
4.	<i>Біосинтез біомаси <i>Rhodotorula mucilaginosa</i></i>	<i>27.03.23-03.04.23</i>	
5.	<i>Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва</i>	<i>04.04.23-10.04.23</i>	
6.	<i>Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	<i>11.04.23-19.04.23</i>	
7.	<i>Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	<i>20.04.23-29.05.23</i>	
8.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>30.05.23-08.05.23</i>	
9.	<i>Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва</i>	<i>09.05.23-17.05.23</i>	
10.	<i>Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва</i>	<i>18.05.23-26.05.23</i>	
11.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>27.05.23-31.05.23</i>	
12.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>27.05.23-31.05.23</i>	

Здобувач

(підпис)

Ростислав КОВАЛЬ

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Оксана СКРОЦЬКА

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу наночастинок срібла з використанням у якості біологічного агента *Rhodotorula mucilaginosa* (номер і назва штаму не вказані, дріжджі були виділені з басейну з мідними відходами), котрий після 20 год культивування використовують у процесі біосинтезу наночастинок срібла протягом 1 год та отримують наночастинок розміром 11 нм сферичної форми. Наночастки срібла можуть чинити протимікробну та противірусну дію, завдяки чому їх можливо використовувати у боротьбі з інфекційними захворюваннями дихальних шляхів. Розрахована потужність виробництва становить 8,4 г (322 л культуральної рідини) наночастинок срібла за місяць, що забезпечить 1% пацієнтів з інфекційними хворобами дихальних шляхів.

Технологічна схема біосинтезу наночастинок срібла включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка та стерилізацію розчину нітрату срібла, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (одна стадія вирощування посівного матеріалу, виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 л з коефіцієнтом заповнення 0,5 та виробничий біосинтез у реакторі об'ємом 30 л). Технологія отримання наночастинок срібла передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом, центрифугування культуральної рідини, промивання біомаси деіонізованою водою, інактивації клітин дріжджів та біосинтез у реакторі після додавання у реакційну суміш нітрату срібла. Розроблено карту постадійного контролю допоміжних робіт та технологічного процесу з наведенням методів контролю концентрації біомаси, джерела азотного та вуглецевого живлення, а також методик контролю срібних наночастинок.

Кваліфікаційна робота викладена на 90 сторінках, містить 20 таблиць, 12 рисунків, складається зі вступу, 10 розділів, списку використаної літератури (74 найменувань), 22 додатків, технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА.....	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА.....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента для отримання наночастинок срібла та поживного середовища для культивування.....	12
2.2. Характеристика біологічного агента <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	16
2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ...	16
2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	19
2.3. Таксономічний статус <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	20
3.1. Потреба населення України у наночастинках срібла для лікування інфекційних захворювань дихальних шляхів.....	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва наночастинок срібла.....	21
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	23
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ <i>RHODOTORULA MUCILAGINOSA</i> ...	25
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента...	25
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у біомасу <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	27
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА.....	36
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу наночастинок срібла	36
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера...	36

5.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	38
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	39
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	47
5.2. Основні етапи виділення та очищення наночастинок срібла.....	50
5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації виділення та очищення наночастинок срібла.....	52
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	54
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	56
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	63
8.1. Мікробіологічний контроль.....	63
8.2. Показники росту.....	64
8.2.1. Концентрація біомаси.....	64
8.2.2. Концентрація джерела вуглецю.....	64
8.2.3. Концентрація джерела азоту.....	65
8.3. Характеристика цільового продукту (наночастинок срібла).....	66
8.3.1. Спектрофотометричний аналіз наночастинок срібла.....	66
8.3.2. Вимірювання на наносайзері.....	66
8.3.3. Трансмісійна електронна мікроскопія.....	66
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА.....	73
9.1. Системи знешкодження рідких відходів.....	73
9.2. Системи знешкодження газових відходів.....	76
9.3. Системи знешкодження та утилізації твердих відходів.....	77
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЄКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА.....	79
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	82
ДОДАТКИ.....	91

ВСТУП

Наночастинки срібла можна синтезувати кількома способами, традиційними серед яких є фізичний та хімічний. Існує також і біологічний метод синтезу наносрібла, котрий є значно екологічно вигіднішим, дешевшим, простішим та менш ресурсозатратним. До того ж використання біологічних продуцентів дає можливість отримувати наночастинки срібла визначеної форми, від чого залежить ступінь їх антимікробної активності. Саме тому актуальною є проблема розробки дешевих та швидких способів біосинтезу наночастинок срібла необхідної форми та розмірів [1,2].

На сьогодні достатньо актуальною є проблема інфекційних захворювань дихальних шляхів, котрі можуть бути спричиненими бактеріями, грибами та вірусами. Дані захворювання є причиною 20% смертей у світі. Зважаючи на це, необхідно є розробка препаратів, котрі здатні пригнічувати розвиток патогенних мікроорганізмів та вірусів, наприклад збудника коронавірусної хвороби. Це можна зробити, створивши нові антибіотики або ж інші речовини, здатні пригнічувати ріст і розвиток збудників хвороб [3,4].

Одним з вирішень даної проблеми можуть стати наночастинки срібла, які здатні проявляти антибактеріальну, протигрибкову та противірусну дію, в тому числі і у відношенні до організмів, котрі мають стійкість до загальноновживаних антибіотиків. Завдяки своїй токсичності та малим розмірам (що є перевагою перед звичайними розчинами срібла, адже вони краще проникають у клітину та мають більшу площу поверхні), за своєю ефективністю вони можуть не поступатися нині відомим антимікробним засобам [1,4]. Окрім використання в якості протимікробного препарату, наночастинки срібла можуть застосовуватись у галузі медицини, текстильної та харчової промисловості [5].

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Коваль Р.В.			ВСТУП		
Консульт.							
Керівник		Скороцька О.І.					
Н. Контр.							
Зав.каф.		Стадніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Акресовано
						7	2
					Кафедра БТМ		

Срібні наночастинки можуть бути синтезовані різними організмами, наприклад рослинами, бактеріями, грибами чи дріжджами. Мікробними продуцентами наночастинок срібла можуть бути штами *Streptomyces griseorubens* AU2, *Rhodotorula glutinis* BNM 0524, *Cryptococcus laurentii* BNM 0525 та *Rhodotorula mucilaginosa* [6,7,8]. Дріжджі *Rhodotorula mucilaginosa* (виділені з басейну з мідними відходами) [8] мають суттєву перевагу над іншими – вони здатні утворювати наночастинки сферичної форми з середнім діаметром 11 нм після культивування продуценту протягом 20 годин [1,2].

Отже, новизною даної роботи є використання дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* (виділені з басейну з мідними відходами) [8], котрі здатні після 20 год культивування продуцента та 1 год біосинтезу утворювати наночастинки з діаметром 11 нм та сферичної форми, з метою отримання противірусного та протимікробного препарату на основі наночастинок срібла. Метою кваліфікаційної роботи є проектування ділянки доферментаційних процесів, виробничого культивування та біосинтезу наночастинок срібла з використанням у якості біологічного агента дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa*, а також складення технологічної та апаратурної схеми процесу.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

Наночастинки срібла – маленькі частинки з розмірами від 1 до 100 нм які містять від 20 до 15000 атомів срібла [9,10]. Враховуючи, що наночастинки срібла містять у своїй структурі відновлене срібло, то наведемо характеристику срібла як елемента хімічної системи. Срібло належить до перехідних металів і займає 47 позицію у періодичній таблиці. Має атомну масу 107,87 г/моль, температура плавлення – 961,78°C, температура кипіння - 2162°C. У чистій формі даний метал має найвищу тепло- та електропровідність серед усіх. Наночастинки срібла використовуються завдяки своїй високій електропровідності та низькій температурі спікання [5]. Можуть мати сферичну плоску форму, несферичну плоску(трикутні, полігональні) та навіть тривимірну форму (кубічні, пірамідальні) [11].

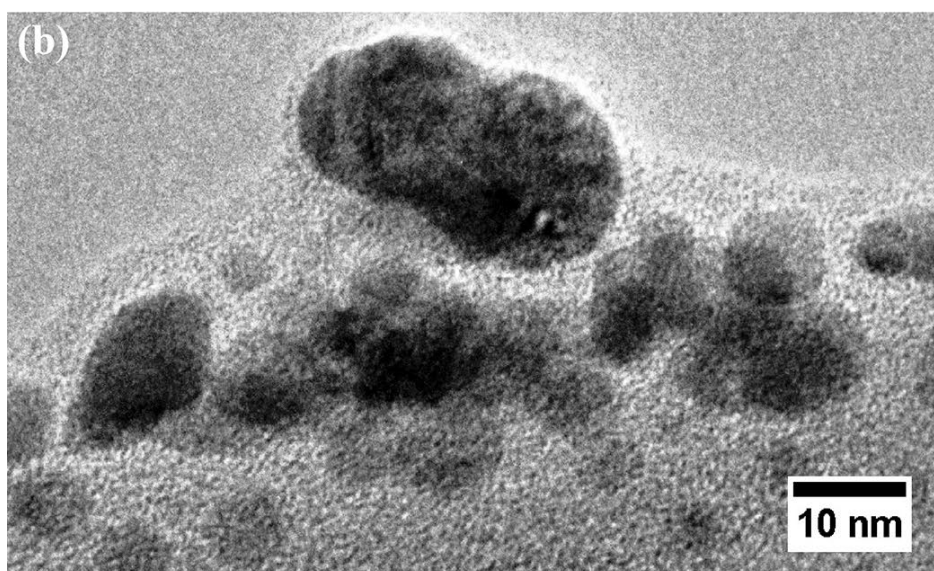


Рис. 1.1. Мікрофотографія наночастинок срібла, зроблена за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу [12]

Традиційні методи синтезу наносрібла, а саме фізичний та хімічний методи, призводять до забруднення навколишнього середовища та підвищення екологічного навантаження, до того ж фізичний метод вважається дуже енергозатратним, а отже дороговартісним. Цю проблему вирішує

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 1 Характеристика наночастинок срібла			Літ.	Арк.	Акресів	
Консульт.										9	3
Керівник		Скороцька О.І.		Кафедра БТМ							
Н. Контр.											
Зав.каф.		Стадніков В.П.									

мікробний синтез наночасточок срібла, який є екологічно чистим порівняно з вище зазначеними способами виробництва через відсутність токсичної дії. Крім того, біосинтез дає змогу виробляти AgNP з визначеною формою та розмірами, від яких залежить їх антимікробна та противірусна дія [2,13].

Завдяки своїм унікальним срібні наночастинки за концентрації не менше 2,5 мкг/л можуть знижувати життєздатність MCF-7 та T47D – двох клітинних ліній раку молочної залози. Така дія може бути зумовлена активацією клітинного ферменту каспази. Апоптоз ракових клітин відбувається за рахунок збільшення концентрації активних форм кисню, яке відбувається внаслідок вивільнення іонів Ag^+ шляхом ендолізу після ендоцитозу біосинтезованих AgNP в клітину [14].

Наночастинки срібла можуть чинити фунгіцидну, бактерицидну та противірусну дію. Вони можуть чинити згубну дію на віруси прямо, наприклад шляхом блокування етапів вірусної реплікації або ж зміни структури капсиду. AgNPs також здатні діяти на віруси опосередковано, змінюючи мембранний потенціал і таким чином блокуючи проникнення вірусу в клітину. Наносрібло може мати роль блокатора нейрамінідази – ферменту, який руйнує зв'язок між рецептором сілової кислоти клітин та гемаглютиніном вірусу [15].

Механізм протимікробної дії полягає у пригніченні реплікації ДНК, порушенні роботи електрон-транспортного ланцюга та синтезу АТФ та порушенні структури клітинної стінки шляхом взаємодії з пептидогліканом. Останній механізм є найбільш розповсюдженим. Наночастинки срібла можуть також змінювати різницю електрохімічних потенціалів і таким чином нівелювати транспортну функцію цитоплазматичної мембрани [2]. Варто зазначити, що за однакових концентрацій срібних наночастинок чутливість до них грибів та бактерій є різною. Дріжджі та гриби є стійкішими до дії AgNPs за рахунок складнішої організації клітин, в той час як бактерії ж мають простішу клітинну організацію і тому є менш стійкими до токсичної дії наночастинок срібла. Та сама тенденція спостерігається при дослідженні

стійкості бактерицидній дії AgNPs грампозитивних та грамнегативних бактерій, що зумовлено різною товщиною шару пептидоглікану [14].

Наведемо приклади косметичних та лікарських засобів, в складі яких є наночастинки срібла (табл. 1.1):

Таблиця 1.1

Косметичні та лікарські засоби на основі наночастинок срібла

Назва засобу	Форма випуску	Кількість діючої речовини (срібло)	Виробник	Джерело
Sovereign Silver	спрей назальний	10 мкг/мл	Sovereign Silver (США)	16
Silver Gel	гель	4 рідкі унції	American Biotech Labs (США)	17
Silver-Max	розчин	10 мкг/мл	Coral Club (США)	18
Сінумікс Аква	спрей назальний	45-55 мг/л	Фітопродукт (Україна)	2
Нокспрей Сільвер	спрей назальний	1,25 мг/л	Sperco (Іспанія)	2
Дефлю Сільвер	спрей назальний	45-55 мг/л	Delta Medical (Швейцарія)	2

Підвищений інтерес до наночастинок срібла зумовлений тим, що вони можуть чинити згубну дію на антибіотикорезистентні мікроорганізми [4]. У медицині наночастинки використовують у біосенсорах, діагностиці, додають до пов'язок та масок, направленому транспорті лікарських речовин в задану область організму та знищення ракових клітин (зумовлено цитотоксичними властивостями), ортопедії. Наночастинки також знайшли своє застосування у харчовій та текстильній промисловості, крім того вони можуть бути застосовані для дезінфекції [5].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента для отримання наночастинок срібла та поживного середовища для культивування

Наночастинки срібла (AgNPs) вперше були синтезовані у 1889 [19]. Оскільки тема курсової роботи стосується використання мікроорганізмів для біогенного синтезу наночастинок, то в роботі розглянемо саме даних продуцентів [12].

Нині серед мікроорганізмів як продуценти наночастинок срібла використовують багато грибів, дріжджів та бактерій, серед них такі як *Rhodotorula mucilaginosa*, *Streptomyces griseorubens* та *Rhodotorula glutinis* [2].

Важливим показником для наночастинок є їх антимікробна активність. Вона залежить від їх розміру – чим менші AgNPs (наночастинки), тим активність вища [1]. Варто також зазначити, що біосинтез наночастинок срібла відбувається за участі метаболітів безклітинного дріжджового екстракту або ж з використанням інактивованої біомаси дріжджів. Тобто, до моменту отримання наночастинок необхідно провести три операції: 1 – культивування біологічного агента, 2 – отримання безклітинного екстракту або інактивація клітин, 3 – біосинтез наночастинок срібла. Розглянемо різних мікробних продуцентів наночастинок срібла (табл. 2.1). Зважаючи на те, що склад поживних середовищ, на яких вирощуються мікроорганізми, є різним, то доцільним є також навести вартість відповідних поживних середовищ (табл. 2.2).

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2 Обґрунтування вибору біологічного агента для біосинтезу наночастинок срібла			Літ.	Арк.	Акц/ув	
Розроб.		Коваль Р.В.									
Консульт.										12	8
Керівник		Скороцька О.І.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Зав.каф.		Стадніков В.П.									

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів наночастинок срібла

Б/а	Склад живильного середовища, г/л		Особливості отримання біомаси б/а	Форма; розміри наночастинок, нм	Параметри біосинтезу наночастинок	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
<i>Streptomyces griseorubens</i> AU2	Солодовий екстракт Дріжджовий екстракт Глюкоза	10 4 4	Культивування у колбах на качалці 28°C, pH 7,3, 130 об/хв, 168 год	Сферичні 5-20	Культивування біомаси, 28°C, 130 об/хв, 48 год Безклітинний супернатант, 50 мл AgNO ₃ , 28°C, 130 об/хв, 48 год	Baygar T., Ugur A. Biosynthesis of silver nanoparticles by <i>Streptomyces griseorubens</i> isolated from soil and their antioxidant activity. <i>IET Nanobiotechnol.</i> 2017, 11(3): 286-291.
<i>Rhodotorula glutinis</i> BNM 0524	Настій яловичого серця Пептон казеїновий кислотний Кукурудзяний крохмаль	2 17,5 1,5	Культивування у колбах на качалці 28°C, pH 7,4, 100 об/хв, 24 год	Сферичні 15	Безклітинний супернатант, 1 мМ AgNO ₃ , 28°C, 100 об/хв, 48 год	Fernández J.G., Fernández-Baldo M.A., Berni E., Camí G., Durán N., Raba J., Sanz M.I. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. <i>Process Biochemistry.</i> 2016, 51(9): 1306-1313
<i>Rhodotorula glutinis</i> (дріжджі виділені з ґрунту)	Солодовий екстракт Глюкоза Дріжджовий екстракт Пептон	3 10 3 5	Культивування у колбах об'ємом 500 мл з 200 мл середовища, 25°C, pH 7, 72 год	Сферичні 0-15	Культивування біомаси, автоклав, 100 мл деіонізованої води, 25°C, 48 год. Безклітинний супернатант, 10 мл AgNO ₃ (10 мМ), 25°C, 168 год	Cunha F.A., Cunha M.C.S.O., Frota S.M., Mallmann E.J.J., Freire T.M., Costa L.S. et al. Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from <i>Rhodotorula glutinis</i> and <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> : antifungal, catalytic and cytotoxicity activities. <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology.</i> 2018, 34: 127

Закінчення табл. 2.1

<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (дріжджі виділені з басейну з мідними відходами)	Дріжджовий екстракт Пептон Глюкоза	10 20 20	Культивування у колбах на качалці 27°C, 150 об/хв, 20 год	Сферичні 11	Інактивована (автоклавуванням) біомаса дріжджів, 100 мг/л AgNO ₃ , 30°C, 150 об/хв, 1 год	Salvadori M.R., Ando A.R., Nascimeto A.C.O., Corrêa B. Dead biomass of Amazon yeast: A new insight into bioremediation and recovery of silver by intracellular synthesis of nanoparticles. <i>Journal of Environmental Science and Health</i> . 2017, A
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (дріжджі були виділені з ґрунту)	Солодовий екстракт Глюкоза Дріжджовий екстракт Пептон	3 10 3 5	Культивування у колбах об'ємом 500 мл з 200 мл середовища, 25°C, pH 7, 72 год	Сферичні 20-30	Культивування біомаси, автоклав, 100 мл деіонізованої води, 25°C, 48 год. Безклітинний супернатант, 10 мл AgNO ₃ (10 мМ), 25°C, 168 год	Agressott E.V.H., Blatte D., Cunha F.A., Noronha V.T., Ciesielski R., Hartschuh A. et al. Vibrational spectroscopy and morphological studies on protein-capped biosynthesized silver nanoparticles. <i>ACS Omega</i> . 2020, 5: 386-393.

Таблиця 2.2

**Вартість поживних середовищ для культивування біологічних агентів,
що використовуються для біосинтезу наночастинок срібла**

Біологічні агенти	Складова живильного середовища	Вміст у ПС, г/л	Ціна складової, грн/кг	Вартість складової (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
<i>Streptomyces griseorubens</i> AU2	Солодовий екстракт	10	46	0,46	1
	Дріжджовий екстракт	4	1100	4,4	2
	Глюкоза	4	23	0,092	1
	Вартість 1 л середовища – 4,952				
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> [12]	Солодовий екстракт	3	46	0,138	1
	Глюкоза	10	23	0,23	1
	Дріжджовий екстракт	3	1100	3,3	2
	Пептон	5	990	4,95	1
	Вартість 1 л середовища – 8,618				
<i>Rhodotorula glutinis</i> BNM 0524	Настій яловичого серця	2	23229	46,45	3
	Пептон казеїновий кислотний	17,5	184,8	3,227	4
	Кукурудзяний крохмаль	1,5	24	0,036	1
	Вартість 1 л середовища – 49,713				
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> [8]	Дріжджовий екстракт	10	1100	11	2
	Пептон	20	990	19,8	1
	Глюкоза	20	23	0,46	1
	Вартість 1 л середовища – 31,26				

Примітка. * - Ціни наведено станом на лютий 2022 р. 1 -

<https://flagma.ua/pshenichno-solodovy-ekstrakt-pse-25-kg-o4928855.html>,
<https://flagma.ua/glyukoza-pishchevaya-o4176821.html>, <https://flagma.ua/pepton-fermentativniy-o10191906.html>, <https://flagma.ua/krohmal-kukurudzyaniy-v-s-o4118572.html>, 2 - <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 3 - <https://us.vwr.com/store/product/11042730/beef-heart-infusion-criteriontm-hardy-diagnostics>, 4 - <https://www.laboratorii.com/reaktivy/komponenty-i-dobavki-k->

Виходячи з даних, наведених у таблиці 2.1, можна зробити висновок, що *Rhodotorula mucilaginosa* (виділені з басейну з мідними відходами) [8] має найкоротший термін культивування мікроорганізмів. За даним показником вони переважають *Streptomyces griseorubens* AU2 у 8,4 рази, *Rhodotorula glutinis* BNM 0524 – у 1,2 рази, а у *Rhodotorula glutinis* (виділені з ґрунту)[12] та *Rhodotorula mucilaginosa* (виділені з ґрунту) [20] – у 3,6 разів. Крім того, стадія біосинтезу наночастинок срібла за використання інактивованих клітин даних дріжджів займає досить короткий період часу (1 год), порівняно з *Streptomyces griseorubens* AU2 (у 96 разів більше), *Rhodotorula glutinis* (виділені з ґрунту) [12] та *Rhodotorula mucilaginosa* (виділені з ґрунту) [20] (у 216 разів більше). Хоча недовіком є висока вартість поживного середовища для культивування дріжджів, яке є дорожчим за середовище для культивування *Rhodotorula mucilaginosa* (виділені з ґрунту) [20] на 22,642 грн/л, а за середовище для культивування *Streptomyces griseorubens* AU2 – на 26,308 грн/л.

Отже, найбільш оптимальним біологічним агентом для біосинтезу наночастинок срібла є дріжджі *Rhodotorula mucilaginosa* (виділені з басейну з мідними відходами) [8], незважаючи на порівняно дорожчу вартість поживного середовища, оскільки з їх використанням можна отримати найменші наночастинки срібла за найкоротший проміжок часу.

2.2. Характеристика біологічного агента *Rhodotorula mucilaginosa*

2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки *Rhodotorula mucilaginosa*

Rhodotorula mucilaginosa (синонім – *Rhodotorula rubra*) – дріжджі роду *Rhodotorula* з клітинами сферичної чи еліпсоподібної форми (рис. 2.1.), довжиною 6,5-14 мкм та шириною 2,5-6,5 мкм (залежно від штаму) [21]. Мають просту клітинну стінку [22].

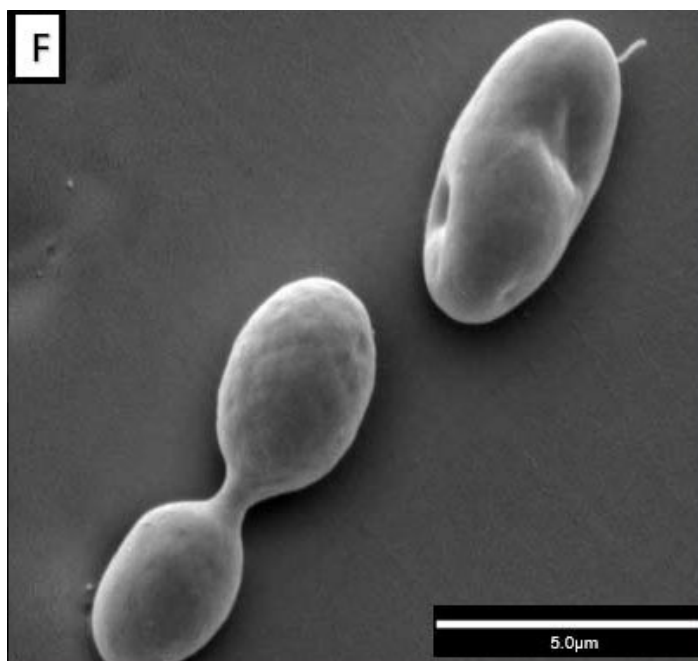


Рис. 2.1. Скануюча електронна мікроскопія клітин *R. mucilaginosa* [22]

Дріжджі *R. mucilaginosa* утворюють круглі блястоконідії без рудиментарного утворення гіфів (рис. 2.2.), мають невелику полісахаридну капсулу (рис. 2.3.), псевдоміцелій не утворюють [22].

На середовищі SDA утворює дріжджові колонії коралово-рожевого кольору, зазвичай гладкі, іноді сітчасті, зморшкуваті, можуть бути вологими або слизоподібними (рис. 2.4.) [21].

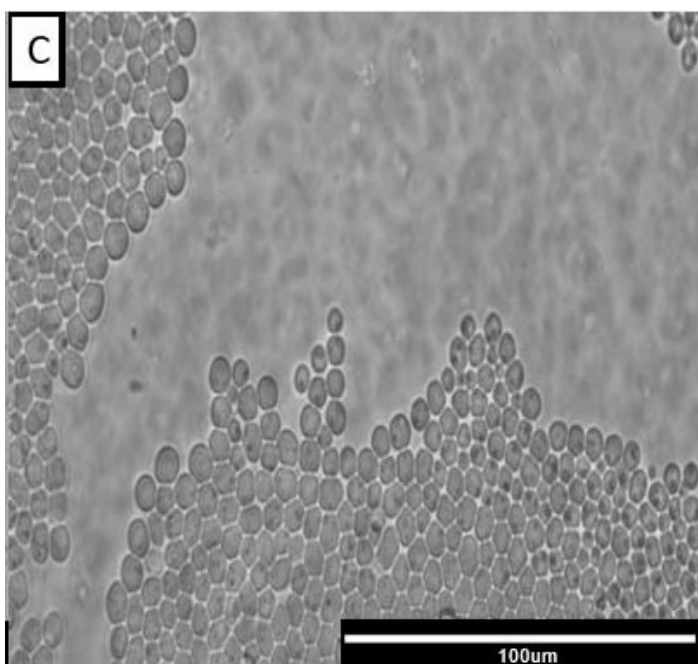


Рис. 2.2. Мікрокультура *R. mucilaginosa* з округлими блястоконідіями [22]

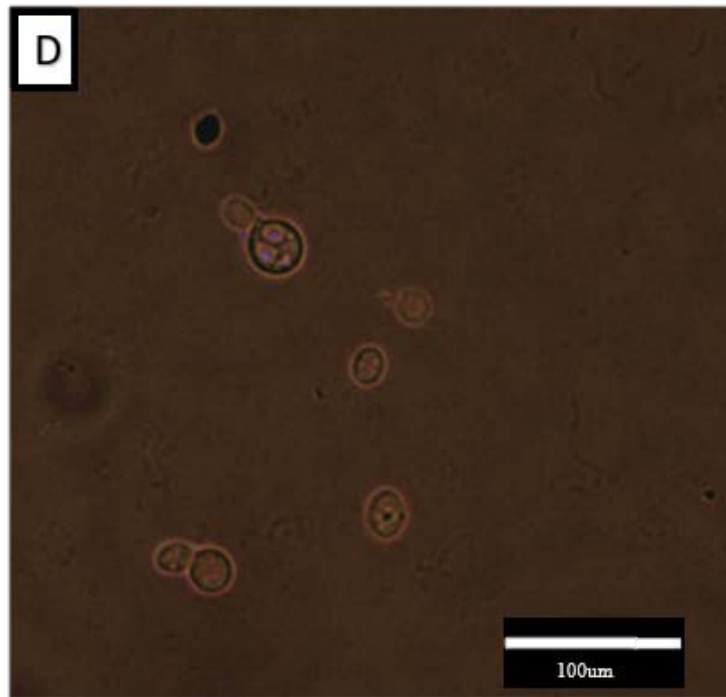


Рис. 2.3. Полісахаридні капсули *R. mucilaginosa*, видимі після обробки китайською тушшю [22]

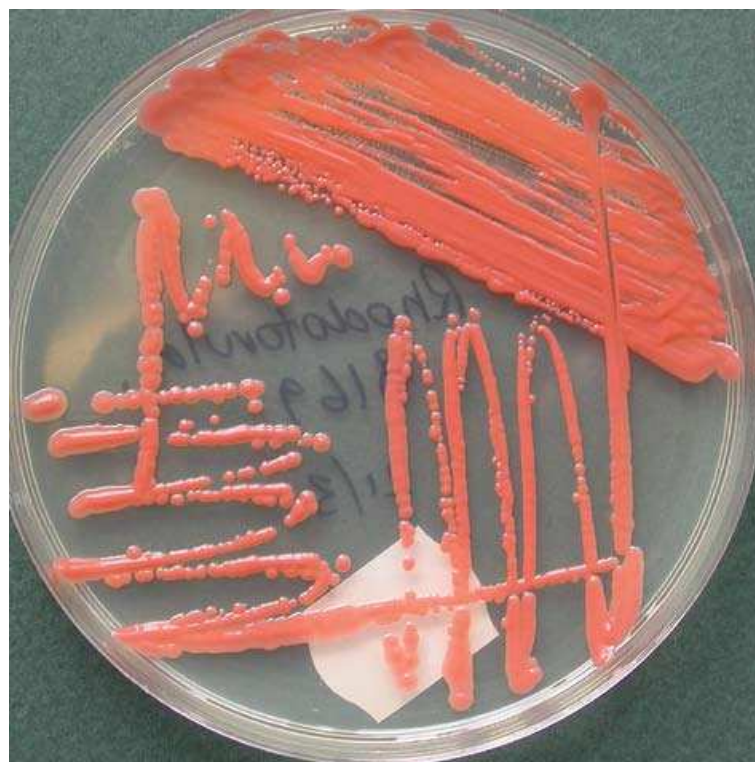


Рис. 2.4. Культура *R. mucilaginosa* на SDA [21]

На агарі з 5% солодового екстракту після 6 днів інкубації при 20°C утворює яйцеподібні або еліпсоподібні клітини розмірами 1,5-4×4-12 мкм, які розташовуються поодинокі чи попарно [23].

2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки *Rhodotorula mucilaginosa*

R. mucilaginosa є облигатними аеробами [24], нездатними до бродіння [23]. За типом живлення – хемоорганотрофи [25].

R. mucilaginosa здатні рости на глюкозі, сахарозі, рафінозі, трегалозі, мальтозі, меліцитозі, саліцині, D-ксилозі, L- та D-арабінозі, D-рибозі, етанолі, гліцеролі, галактозі, рибітолі, сукцинаті, цитраті, D-глюконаті, деякі штами здатні до росту на метил- α -D-глюкозиді, L-сорбозі, D-манітолі та лактаті. Непридатними для вирощування *R. mucilaginosa* є інουλін, мелібіоза, лактоза, розчинний крохмаль, L-рамноза, метанол, еритритол, галактитол, та D-глюкозамін. Дані дріжджі здатні перетворювати похідні гліцерину в каротиноїди. Здатні до вегетативного розмноження, брунькуються в основному полярно [23].

R. mucilaginosa стійкі до каспофунгіну та флюконазолу, проте є помірно чутливими до ітраконазолу та вориконазолу й чутливими до флуцитозину та амфотерицину В [21].

Даний мікроорганізм не здатний рости за температури вище 35°C [23], а оптимальна температура – 30°C. Оптимальне значення рН для росту – 5,5 [26].

2.3. Таксономічний статус *Rhodotorula mucilaginosa*

Філогенетичну класифікацію для *R. mucilaginosa* наведено відповідно до даних, зазначених у базі даних MycoBank [30].

Домен – *Eukaryota*

Царство – *Fungi*

Підцарство – *Dikarya*

Відділ – *Basidiomycota*

Підвідділ – *Pucciniomycotina*

Клас – *Cystobasidiomycetes*

Порядок – *Cystobasidiales*

Рід – *Rhodotorula*

Вид – *mucilaginosa*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреби населення України у наночастинках срібла для лікування інфекційних захворювань дихальних шляхів

Інфекційні хвороби, що можуть бути зумовлені вірусами та мікроорганізмами, є причиною кожної п'ятої смерті у світі. Важливе місце серед таких патологій займають респіраторні захворювання. Найбільш гострою на даний момент є проблема епідемії COVID-19, проте не слід забувати і про ураження дихальних шляхів, зумовлені бактеріями та грибами. Можливим вирішенням у цьому випадку можуть бути наночастинки срібла, котрі мають противірусну та протимікробну дію, зокрема здатні згубно діяти на збудників пневмонії та коронавірусної хвороби [3]. Варто зазначити, що на вітчизняному ринку присутні кілька препаратів, що мають в своїй основі наносрібло і які використовуються в якості допоміжного засобу при нежиті [2], який супроводжується аденоїдитом, ринітом та риносинуситом. У таблиці 3.1 наведені деякі з них:

Таблиця 3.1

Назва засобу	Форма випуску	Кількість діючої речовини (срібло)	Виробник	Джерело
Сінумікс Аква	спрей назальний	45-55 мг/л	Фітопродукт (Україна)	2
Нокспрей Сільвер	спрей назальний	1,25 мг/л	Sperco (Іспанія)	2
Дефлю Сільвер	спрей назальний	45-55 мг/л	Delta Medical (Швейцарія)	2

Проведені дослідження свідчать, що срібні наночастинки у концентрації 100 мкг/мл, введені інгаляційним шляхом, здатні повністю пригнічувати діяльність патогенних мікроорганізмів та вірусів дихальних шляхах [27].

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрів	
Консульт.							20	5	
Керівник		Скроцька О.І.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Зав.каф.		Стадніков В.П.							

Пропонується використовувати 4 мл засобу на добу протягом 5 днів. За 2021 рік в Україні зафіксовано приблизно 7,2 мільйони випадків інфекційних захворювань дихальних шляхів, із них на січень припадає близько 420000 випадків [28]. Дані, наведені у підрозділі, підсумуємо у вигляді таблиці 3.2:

Таблиця 3.2

Група пацієнтів	Доза препарату на добу, мл	Вміст наночасток срібла в дозі препарату на добу, мкг	Тривалість прийому, дів	Кількість наночасток срібла на 1 людину, мкг	Кількість хворих в Україні станом на січень 2021 року, тис. осіб	Загальна кількість наночасток срібла на всіх хворих, г
Люди, уражені інфекціями дихальних шляхів	4	400	5	2000	420	840

Отже, згідно з даними таблиці 3.2, місячна потреба в наночастинках срібла для лікування інфекційних хвороб дихальних шляхів становить 840 г.

3.2. Розрахунок потужності виробництва наночастинок срібла

Згідно з попередніми розрахунками (див. п.3.1), місячна потреба у наночастинках срібла для лікування інфекційних захворювань дихальних шляхів складає 840 г.

Враховуючи наявність на українському ринку протівірусних та протимікробних препаратів, а також складність введення препарату до протоколів лікування хвороб, пропонується забезпечити цим засобом 1% хворих. Отже, вироблятимемо наночастинки срібла у кількості:

$$G_{\text{гп}} = \frac{840 \times 1}{100} = 8,4 \text{ г}$$

Для здійснення наступних розрахунків потрібно прийняти до уваги наступне:

1) Для біогенного синтезу наночастинок срібла використовують інактивовану біомасу *Rhodotorula mucilaginosa* [8].

2) У процесі біосинтезу срібних наночастинок застосовується 1 мМ нітрату аргентуму (AgNO_3), що рівно 0,108 г срібла на 1 л реакційної суміші. Таким чином, щоб одержати 8,4 г наночастинок срібла потрібно використати 78 мМ AgNO_3 .

3) Беручи до уваги той факт, що біоредукція срібла складає до 30% [2], з 0,108 г відновиться лише 0,0324 г. Таким чином, щоб одержати 8,4 г срібних наночастинок потрібно використати у 3,3 рази більше срібла, що складе 257,4 мМ AgNO_3 .

Отже, кількість емульсії інактивованої біомаси, потрібного для одержання 8,4 г срібних наночастинок складає 257,4 л.

З врахуванням сумарних втрат цільового продукту у процесі виділення (20%), потрібно одержувати таку кількість емульсії інактивованої біомаси:

$$V_{\text{кр}} = \frac{257,4}{1 - (0,1+0,1)} = 322 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Враховуючи втрати в процесі виділення, з метою забезпечення місячної потреби у наночастинок срібла (згідно з п.3.2) будемо отримувати 322 л культуральної рідини.

Розрахуємо кількість культуральної рідини за цикл ферментації. Кількість трудоднів приймемо за 30. З урахуванням цього, за добу необхідно отримувати наступний культуральної рідини:

$$V_{\text{д}} = \frac{V_{\text{гп}}}{T_{\text{тр}}} = \frac{322}{30} = 10,7 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл становитиме:

$$V_{\text{цк}} = \frac{K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,1 \times 10,7 \times 26,5}{24} = 13 \text{ л}$$

де $T_{\text{цф}}$ – робочий цикл ферментера, до складу якого входить час здійснення культивування біологічного агента та виробничого біосинтезу (22 год) та час, необхідний для забезпечення готовності ферментера до процесу (4,5 год); K_1 – коефіцієнт запасу для врахування імовірності нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

До процесу забезпечення готовності ферментера входить його миття та огляд (в середньому 30 хв), перевірка герметизації (приблизно 30 хв), нагрів (30 хв), стерилізація гострою парою (60 хв), охолодження (30 хв), подача середовища (30 хв), внесення інокуляту (30 хв), викачування культуральної рідини (30 хв).

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Rhodotorula mucilaginosa

Для отримання 13 л культуральної рідини за один цикл потрібно прийняти до уваги втрати внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які складатимуть 10%. Таким чином, кількість поживного середовища та інокуляту перед виробничим біосинтезом у самому ферментері складатиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}(1 + E_{\text{ф}}) = 13(1 + 0,1) = 14,3$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини в процесі біосинтезу.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 14,3 л. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,5 геометричний об'єм ферментера становить: $V_{\text{ф}} = 14,3/0,5 = 28,6$ л. Приймемо найближчий за об'ємом стандартний ферментер: $V_{\text{ст 1}} = 30$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{z1} = 14,3/30 = 0,476$ – не перевищує заданого значення, що свідчить про правильний вибір геометричного об'єму ферментера.

Частка інокуляту від об'єму живильного середовища складає 10%.

Для засіву $V_{роб.1} = 14,3$ л середовища необхідно приготувати:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} \cdot X_{ф} = 14,3 \cdot 0,1 = 1,43 \text{ л л посівного матеріалу}$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза інокуляту для засіву ферментера.

Таким чином, кількість поживного середовища у апараті складатиме:

$$V_{пс} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 14,3 - 1,43 = 12,87 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{пм1} = 1,43$ л (1430 мл) для засіву ферментера можна здійснити шляхом вирощування дріжджів у колбах на качалці. З цією метою доцільно використати спеціальні колби з об'ємом 750 мл, заповнюючи їх не більше, ніж на 20% ($K_{зк} = 0,2$). В такому разі слід використати:

$$N_{колб} = V_{пм1} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 1430 / (750 \cdot 0,2) = 9,5 = 10 \text{ колб}$$

Таким чином, відповідно до отриманих даних для біосинтезу наночастинок срібла дріжджами *Rhodotorula mucilaginosa* необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 30 л та 10 качалочних колб.

Таблиця 3.3

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки інокуляту та виробничого культивування

№ стадії	Об'єм культуральної рідини, $V_{кр}$, л	Уточнений об'єм культуральної рідини, $V_{роб}$, л	Об'єм інокуляту, $V_{пм}$, л	Об'єм живильного середовища, $V_{пс}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, л
II	13	14,3	1,43	12,87	0,5	30
I	1,43	1,43	0,143	1,287	0,2	10 колб

Виходячи з отриманих результатів, посівний матеріал для забезпечення виробничого біосинтезу отримують за один етап.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Для вирощування дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* джерелом енергії та вуглецю є глюкоза [8]. Зважаючи на те, що у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [29] схему катаболізму глюкози у *Rhodotorula mucilaginosa* не наведено, як і всіх інших представників роду *Rhodotorula*, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо найбільш спорідненого організму – *Saccharomyces cerevisiae*.

Згідно з припущенням та використанням як основи для створення шляху катаболізму глюкози гліколіз, або ж шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, котрий представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, наводимо схему перетворення глюкози.

Глюкоза за участі ферменту гексокінази (КФ.2.7.1.1) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, котра в свою чергу під дією глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ.5.3.1.9) перетворюється на фруктозо-6-фосфат. За допомогою 6-фосфотриозофруктокінази (КФ.2.7.1.11) відбувається активація перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-дифосфат. Фруктозодифосфатальдольаза (КФ.4.1.2.13) каталізує утворення дигідроксиацетонфосфату та гліцеральдегід-3-фосфату з фруктозо-1,6-дифосфату. Дигідроксиацетонфосфат під дією триозофосфатізомерази (КФ. 5.3.1.1) перетворюється у гліцеральдегід-3-фосфат, останній далі переходить у 1,3-дифосфогліцерат за допомогою ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12).

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 4 Біосинтез біомаси <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Літ.	Арк.
Консульт.							25
Керівник		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ	
Н. Контр.							
Зав.каф.		Стадніков В.П.					

У подальшому 1,3-дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат, із якого в свою чергу утворюється 2-фосфогліцерат під дією 2,3-дифосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази (КФ. 5.4.2.11). Енолаза (4.2.1.11) каталізує перетворення 2-фосфогліцерату на фосфоенолпіруват. Процес закінчується перетворенням фосфоенолпірувати у пірувати за участі піруваткінази (КФ.2.7.1.40).

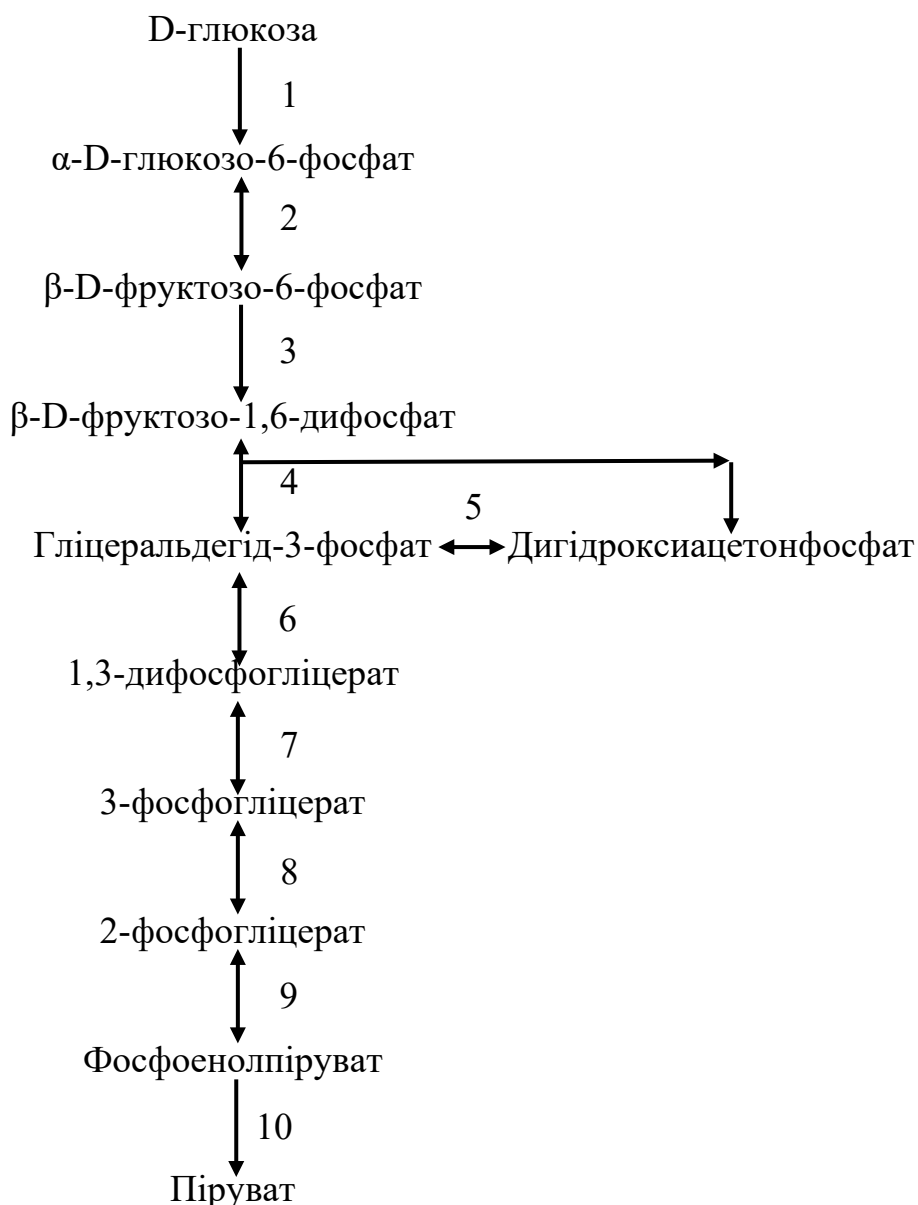


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозо-дифосфаталядолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 –

гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-дифосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у біомасу *Rhodotorula mucilaginosa*

Оскільки ростовий субстрат, на якому вирощується *Rhodotorula mucilaginosa* не біотрансформується у цільовий продукт (наночастинки срібла), то доцільним буде описати його біотрансформацію у біомасу, яку необхідно отримати для подальшого біосинтезу наночастинок.

Під час росту *R. mucilaginosa* з використанням глюкози як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму шляхом гліколізу утворюється піруват, який далі перетворюється в ацетил-КоА під дією ферментів піруватдегідрогенази K1 компоненту (КФ 1.2.4.1) та піруватдегідрогенази K2 компоненту (КФ 2.3.1.12), ацетил-КоА далі залучається до циклу трикарбонових кислот. Під дією ферменту цитратсинтази (КФ 2.3.3.1) ацетил-КоА та оксалоацетат, синтезований з пірувату з допомогою ферменту піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1), перетворюються в цитрат, який в подальшому перетворюється в ізоцитрат за допомогою ферменту аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3). Ізоцитрат під дією ферменту ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42) утворює 2-оксоглутарат, котрий в свою чергу з допомогою ферментів 2-оксоглутаратдегідрогенази K1 компоненту (КФ 1.2.4.2), 2-оксеглутаратдегідрогенази K2 компоненту (КФ 2.3.1.61) та бета-субодиниці сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.4) перетворюється в сукцинат. Фермент сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1) каталізує утворення з сукцинату фумарату, який далі перетворюється у малат під дією фумаратгідратази II класу (КФ 4.2.1.2). Малат під дією ферменту малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) перетворюється в оксалоацетат.

Анаплеротичними реакціями є карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату під дією піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1), перетворення

фосфоенолпірувату на оксалоацетат під дією фосфоенолпіруваткарбоксикінази (АТФ) (КФ 4.1.1.49), перетворення пірувату на малат під дією оксалоацетат-декарбоксилувальна малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.38).

Проміжний продукт гліколізу, дигідроксиацетонфосфат, котрий утворюється з гліцеральдегід-3-фосфату під дією триозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1), застосовується для подальшого синтезу ліпідів. Під дією ферменту дигідроксиацетонфосфатацилтрансферази (КФ 2.3.1.42) він перетворюється в ацилгліцеролфосфат, котрий у подальшому за допомогою ферменту ацилгліцеронфосфатредуктази (КФ 1.1.1.101) утворює лізофосфатидат. Останній перетворюється у фосфатидат під дією лізофосфатидатацилтрансферази (КФ 2.3.1.51). Фермент фосфатидатфосфатаза (КФ 3.1.3.4) каталізує перетворення фосфатидату у 1,2-діацилгліцерин, останній далі утворює тригліцерид під дією ферменту фосфоліпід: діацилгліцеролацилтрансфераза (КФ 2.3.1.158).

Жирні кислоти, що входять до складу ліпідів, синтезуються шляхом утворення ацетил-АПБ з ацетил-КоА під дією бета-субодиниці синтази жирних кислот грибового типу (КФ 2.3.1.86), який є попередником жирних кислот. Для синтезу жирних кислот також необхідний малоніл-АПБ, котрий синтезується під дією ферменту [ацил переносний білок] S-малонілтрансферази (КФ 2.3.1.39) з малоніл-КоА, котрий у свою чергу можна отримати з ацетил-КоА за допомогою ацетил-КоА карбоксилази (КФ 6.4.1.2).

Амінокислоти глутаматної родини утворюються з 2-оксоглутарату. Під дією ферменту аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1) з нього утворюється глутамат, з якого в подальшому з допомогою ферменту ацетил-КоА: L-глутамат-N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.1) утворюється N-ацетилглутамат. Фермент ацетилглутаматкіназа (КФ 2.7.2.8) каталізує перетворення N-ацетилглутамату у N-ацетилглутаматфосфат, який в подальшому під дією N-ацетил-гамма-глутаміл-фосфатредуктази (КФ 1.2.1.38) утворює 2-ацетоамідо-

5-оксопентаноат. Останній за допомоги ферменту ацетилорнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11) перетворюється у N-ацетилорнітин, який у свою чергу переходить у орнітин під дією глутамат-N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.35). Далі він перетворюється у цитрулін під дією орнітинкарбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.3). Цитрулін в свою чергу перетворюється в аргінін через L-аргініносукцинат під дією ферментів аргініносукцинатсинтази (КФ 6.3.4.5) та аргініносукцинатліази (КФ 4.3.2.1). Аргіназа (КФ 3.5.3.1) каталізує перетворення аргініну в орнітин. З глутамату утворюється також L-глутамат-5-напівальдегід під дією 1-піролін-5-карбоксилатдегідрогенази (КФ 1.2.1.88). L-глутамат-5-напівальдегід далі перетворюється у пролін за допомогою ферменту піролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2). Для синтезу лізину 2-оксоглутарат реагує з ацетил-КоА під дією гомоцитратсинтази (КФ 2.3.3.14) з утворенням гомоцитрату. Останній за допомогою ферменту гомоаконітази (КФ 4.2.1.-) утворює гомо-цис-аконітат, який в свою чергу перетворюється на гомоізоцитрат під дією гомоаконітатгідратази (КФ 4.2.1.36). В подальшому вона за під дією ферменту гомоізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.87) переходить у 2-оксоадипат, який далі утворює L-2-аміноадипат за допомогою 2-аміноадипаттрансамінази (КФ 2.6.1.39). L-2-аміноадипат у три етапи перетворюється у L-2-аміноадипат-6-напівальдегід під дією L-2-аміноадипатредуктази (КФ 1.2.1.95). Фермент сахаропіндегідрогеназа (НАДФ+) (КФ 1.5.1.10) каталізує перетворення L-2-аміноадипат-6-напівальдегіду у L-сахаропін, котрий у свою чергу утворює лізин під дією сахаропіндегідрогенази (НАД+) (КФ 1.5.1.7). Також з глутамату під дією ферментів глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) та глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) можна отримати глутамін.

Попередником аланіну, валіну та лейцину є піруват. З 3-фосфогліцерату утворюється серин, з якого далі синтезуються гліцин та цистеїн. Попередником аспартатної родини амінокислот (аспартат, аспарагін, метіонін,

треонін та ізолейцин) є оксалоацетат. Для синтезу ж родини ароматичних амінокислот та гістидину необхідні 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Два останніх є інтермедіатами пентозофосфатного циклу.

Пентозофосфатний цикл стартує із реакції, у якій α -D-глюкозо-6-фосфат перетворюється у β -D-глюкозо-6-фосфат під дією глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9). β -D-глюкозо-6-фосфат далі за допомогою глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогенази (КФ 1.1.1.49) перетворюється у D-глюконо-1,5-лактон-6-фосфат, який утворює D-глюконат-6-фосфат під дією ферменту 6-фосфоглюконолактонази (КФ 3.1.1.31). 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44) каталізує перетворення D-глюконат-6-фосфату в D-рибулозо-5-фосфат, який далі утворює D-ксилулозо-5-фосфат під дією рибулозофосфат-3-епімерази (КФ 5.1.3.1) та D-рибозо-5-фосфат під дією рибозо-5-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.6). D-ксилулозо-5-фосфат далі утворює β -D-фруктозо-6-фосфат та D-еритрозо-4-фосфат за допомогою ферменту транскетолази (КФ 2.2.1.1). Перетворення β -D-фруктозо-6-фосфату на β -D-глюкозо-6-фосфат каталізується глюкозо-6-фосфатізомеразою (КФ 5.3.1.9).

Для синтезу піримідинових нуклеотидів потрібен карбамоїлфосфат, який утворюється з глутаміну за допомогою ферменту карбамоїлфосфатсинтази (КФ 6.3.5.5). Карбамоїлфосфат далі під дією аспартаткарбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2) перетворюється на N-карбамоїл-L-аспартат, який в свою чергу утворює дигідрооротат за допомогою дигідрооротази (КФ 3.5.2.3). Фермент дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.98.1) каталізує утворення оротату з дигідрооротату. Далі у результаті реакції оротату з 5-фосфорибозил-1-пірофосфатом під дією оротатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10) утворюється оротидин-5-фосфат, який далі переходить у уридинмонофосфат за допомогою оротидин-5-фосфатдекарбоксилази (КФ 4.1.1.23). Реакцію утворення уридиндифосфату з уридинмонофосфату каталізує фермент аденілаткіназа (КФ 2.7.4.14).

Фермент нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6) каталізує перетворення уридиндифосфату в уридинтрифосфат, який у свою чергу перетворюється на цитидинтрифосфат під дією ЦТФ-синтази (КФ 6.3.4.2).

Для синтезу пуринових нуклеотидів із 5-фосфорибозил-1-пірофосфату утворюється 5-фосфорибозиламін під дією амідфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.14). 5-фосфорибозиламін далі утворює 5-фосфорибозилгліцинамід за допомогою ферменту фосфорибозиламін-гліцинлігази (КФ 6.3.4.13), а фермент фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (КФ 2.1.2.2) каталізує перетворення 5-фосфорибозилгліцинаміду в N-формілгліцинамід рибонуклеотид. Останній під дією фосфорибозилформілгліцинамідинсинтази (КФ 6.3.5.3) переходить у 5-фосфорибозил-формілгліцинамід, який у свою чергу утворює 5-фосфорибозил-5-аміноімідазол за допомогою ферменту фосфорибозилформілгліцинамідинциклолігази (КФ 6.3.3.1). Фосфорибозиламіноімідазолкарбоксилаза (КФ 4.1.1.21) каталізує перетворення 5-фосфорибозил-5-аміноімідазолу в 5-фосфорибозил-4-карбокси-5-аміноімідазол. Надалі він утворює 5-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамід)-5-аміноімідазол за допомогою ферменту фосфорибозиламіноімідазолсукцинокарбоксиамідсинтази (КФ 6.3.2.6). Під дією аденілосукцинатліази (КФ 4.3.2.2) із 5-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамід)-5-аміноімідазолу утворюється 5-фосфорибозил-4-карбамоїл-5-аміноімідазол. Останній за допомогою ферменту фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формілтрансферази (КФ 2.1.2.3) перетворюється на 5-фосфорибозил-5-формамідо-4-імідазолкарбоксамід, який у свою чергу утворює інозинмонофосфат під дією циклогідролази ІМФ (КФ 3.5.4.10). Інозинмонофосфат далі перетворюється на ксантозин-5-фосфат під дією ІМФ дегідрогенази (КФ 1.1.1.205) і на аденілосукцинат під дією аденілосукцинатсинтази (КФ 6.3.4.4). Аденілосукцинат далі перетворюється на аденозин-5-фосфат за допомогою аденілосукцинатліази (КФ 4.3.2.2), а ксантозин-5-фосфат перетворюється на гуанозинмонофосфат за допомогою

ГМФ-синтази (КФ 6.3.5.2). Далі аденозин-5-фосфат переходить у аденозин-5-дифосфат під дією аденілаткінази (КФ 2.7.4.3), в той час як гуанозинмонофосфат переходить у гуанозиндифосфат під дією гуанілаткінази (КФ 2.7.4.8). Фермент нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6) каталізує утворення відповідних трифосфатів з аденозин-5-дифосфату та гуанозиндифосфату.

До складу клітинної стінки дріжджів входять полісахариди манан та глюкан. Синтез глюкану починається з утворення D-глюкозо-1-фосфату з α -D-глюкозо-6-фосфату під дією фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2). Далі D-глюкозо-1-фосфат за допомогою ферменту УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилтрансферази (КФ 2.7.7.9) перетворюється на УДФ-глюкозу, яка в свою чергу утворює 1,3- β -глюкан під дією 1,3- β -глюкансинтази (КФ 2.4.1.34). Для біосинтезу манану β -D-фруктозо-6-фосфат переходить у D-манозо-6-фосфат за допомогою манозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.8). Фосфоманомутаза (КФ 5.4.2.8) каталізує перетворення D-манозо-6-фосфату на D-манозо-1-фосфат, який у свою чергу утворює попередника манану – ГДФ-манозу – під дією манозо-1-фосфатгуанілілтрансферази (КФ 2.7.7.13).

Умовні позначення: —► - основний шлях біосинтезу

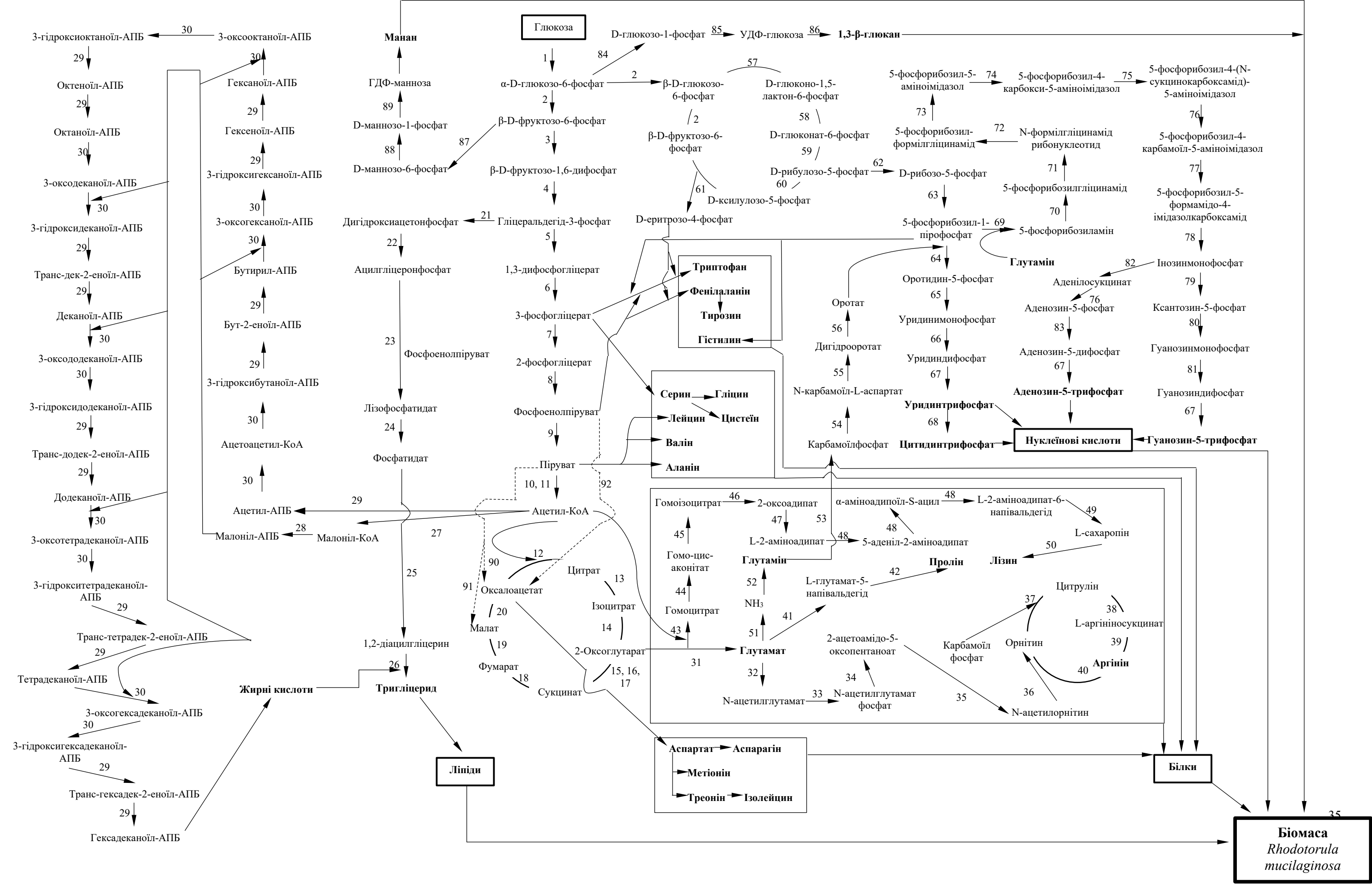
-----► - анаплеротичні реакції

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозо-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 7 – 2,3-дифосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 8 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 9 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 10 – піруватдегідрогеназа К1 компонент (КФ 1.2.4.1); 11 – піруватдегідрогеназа К2 компонент (КФ 2.3.1.12); 12 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 15 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа К1 компонент (КФ 1.2.4.2); 16 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа К2 компонент (КФ

2.3.1.61); 17 – бета-субодиниця сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.4); 18 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 19 – фумаратгідратаза клас II (КФ 4.2.1.2); 20 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 21 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 22 – дигідроксиацетонфосфатацилтрансфераза (КФ 2.3.1.42); 23 – ацилгліцеронфосфатредуктаза (КФ 1.1.1.101); 24 – лізофосфатидатацилтрансфераза (КФ 2.3.1.51); 25 – фосфатидатфосфатаза (КФ 3.1.3.4); 26 – фосфоліпід: діацилгліцеролацилтрансфераза (КФ 2.3.1.158); 27 – ацетил-КоА карбоксилаза (КФ 6.4.1.2); 28 – [ацил переносний білок] S-малонілтрансфераза (КФ 2.3.1.39); 29 – бета-субодиниця синтази жирних кислот, грибовий тип (КФ 2.3.1.86); 30 – альфа-субодиниця синтази жирних кислот, грибовий тип (КФ 2.3.1.86); 31 – аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 32 – ацетил-КоА: L-глутамат-N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.1); 33 – ацетилглутаматкіназа (КФ 2.7.2.8); 34 – N-ацетил-гамма-глутаміл-фосфатредуктаза (КФ 1.2.1.38); 35 – ацетилорнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11); 36 – глутамат-N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.35); 37 – орнітинкарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.3); 38 – аргініносукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.5); 39 – аргініносукцинатліаза (КФ 4.3.2.1); 40 – аргіназа (КФ 3.5.3.1); 41 – 1-піролін-5-карбоксилатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.88); 42 – піролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 43 – гомоцитратсинтаза (КФ 2.3.3.14); 44 – гомоаконітаза (КФ 4.2.1.-); 45 – гомоаконітатгідратаза (КФ 4.2.1.36); 46 – гомоізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.87); 47 – 2-аміноадипаттрансаміназа (КФ 2.6.1.39); 48 – L-2-аміноадипатредуктаза (КФ 1.2.1.95); 49 – сахаропіндегідрогеназа (НАДФ+) (КФ 1.5.1.10); 50 – сахаропіндегідрогеназа (НАД+) (КФ 1.5.1.7); 51 – глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.2); 52 – глутамінсинтаза (КФ 6.3.1.2); 53 – карбамоїлфосфатсинтаза (КФ 6.3.5.5); 54 – аспартаткарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 55 – дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3); 56 – дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.98.1); 57 – глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49); 58 – 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31); 59 – 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44); 60 –

рибулозофосфат-3-епімераза (КФ 5.1.3.1); 61 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 62 – рибозо-5-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.6); 63 – рибозофосфатпірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 64 – оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10); 65 – оротидин-5-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23); 66 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.14); 67 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 68 – ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 69 – амідофосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14); 70 – фосфорибозиламін-гліцинлігаза (КФ 6.3.4.13); 71 – фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (КФ 2.1.2.2); 72 – фосфорибозилформілгліцинамідінсинтаза (КФ 6.3.5.3); 73 – фосфорибозилформілгліцинамідінциклолігаза (КФ 6.3.3.1); 74 – фосфорибозиламіноімідазолкарбоксилаза (КФ 4.1.1.21); 75 – фосфорибозиламіноімідазолсукцинокарбоксиамідсинтаза (КФ 6.3.2.6); 76 – аденілосукцинатліаза (КФ 4.3.2.2); 77 – фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формілтрансфераза (КФ 2.1.2.3); 78 – циклогідролаза ІМФ (КФ 3.5.4.10); 79 – ІМФ дегідрогеназа (КФ 1.1.1.205); 80 – ГМФ-синтаза (КФ 6.3.5.2); 81 – гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8); 82 – аденілосукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.4); 83 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 84 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 85 – УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилтрансфераза (КФ 2.7.7.9); 86 – 1,3-β-глюкансинтаза (КФ 2.4.1.34); 87 – манозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.8); 88 – фосфоманомутаза (КФ 5.4.2.8); 89 – манозо-1-фосфатгуанілілтрансфераза (КФ 2.7.7.13); 90 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 91 – оксалоацетат-декарбоксилювальна малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.38); 92 – фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49).

Рис. 4.2. Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт



РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу наночастинок срібла

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Зважаючи на те, що оптимальними умовами для вирощування *R. mucilaginosa* є температура 27°C та значення рН 5,5 [23,26], виникає можливість забруднення іншими термофільними та нейтрофільними організмами. Через це виникає необхідність створення асептичних умов, що є доволі проблематичним у випадку поверхневого культивування, адже це тягне за собою стерилізацію обладнання, поживного середовища та аераційного повітря [31,32]. Виходячи з цього, процес культивування *R. mucilaginosa* задля подальшого використання штаму для біосинтезу наночастинок срібла здійснюють глибинним способом.

Зважаючи на те, що для безпосереднього синтезу НЧ срібла використовується мертва біомаса дріжджів [8], отримувана методом автоклавування при 120°C протягом 15 хвилин [33,34], безперервний процес культивування *R. mucilaginosa* є недоцільним.

Отже, культивування *R. mucilaginosa* проводять періодично глибинним способом в умовах постійної аерації та із забезпеченням асептики протікання процесу.

Конструкція та обладнання ферментера може відрізнятися в залежності від умов культивування біологічного агента. Обравши спосіб культивування та ознайомившись з фізіолого-біохімічними особливостями *R. mucilaginosa*, необхідно визначитися з оснащенням для ферментера, що може забезпечити потрібні умови.

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 5 Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва	Літ.	Арк.	Акрснів	
Консульт.							36	18	
Керівник		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Зав.каф.		Стадніков В.П.							

1. Зважаючи на те, що *R. mucilaginosa* є облигатним аеробом, необхідно забезпечити інтенсивну аерацію у процесі культивування. Для забезпечення таких умов ферментер повинен бути оснащений барботером, котрий дасть змогу збільшити масообмін у товщі шару поживного середовища. Також є необхідним встановлення газоаналізатору для контролю ферментаційних умов та контролю концентрації CO₂, а також датчика розчиненого кисню [22].

2. З метою покращення та пришвидшення масообмінних процесів та підвищення рівня гомогенності культуральної рідини необхідно забезпечити перемішування з частотою обертів від 150 об/хв.

Оскільки культивування *R. mucilaginosa* не передбачає використання перемішуючого пристрою певної особливої конструкції і типу (адже продуцент не утворює міцелію чи псевдоміцелію) [22], то він обирається довільно. Оберемо лопатеву мішалку.

3. Для контролю кислотності культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

4. З метою підтримки температури на сталому рівні необхідно забезпечити ферментер температурним датчиком та сорочкою[32].

5. Задля запобігання можливого утворення піни будемо використовувати хімічні піногасники, додавання яких буде регулюватися датчиком піни.

Промислові ферментери об'ємом 30 л виготовляє фірма «BLBIO» (Китай). Ферментери, вироблені на цій фірмі, мають автоматичну систему стерилізації, забезпечують асептичні умови внесення інокуляту, обладнані портами для відбору проб, встановлення датчиків контролю рівня піни, тиску, температури, рН. Дані апарати оснащені засобами для подачі газів, а також мішалкою з частотою обертів 70-1000 об/хв.

Отже, для проведення виробничого біосинтезу необхідно проводити культивування *R. mucilaginosa* необхідно проводити в асептичних умовах глибинним способом, передбачивши наявність перемішуючого пристрою та

барботера для забезпечення аерації.

5.1.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Rhodotorula mucilaginosa є облигатним аеробом [22], через що під час процесу культивування повинна бути забезпечена безперервна подача стерильного аераційного повітря через барботер. Це робить отримання великих об'ємів стерильного повітря для аерації одним із найважливіших завдань.

Підготовка інокуляту проводиться у лабораторному приміщенні та лабораторному боксі, де повітря стерилізується шляхом застосування УФ-ламп.

Підготовка стисненого стерильного аераційного повітря для ферментеру здійснюється наступним чином:

1. Для забезпечення меншої кількості мікроорганізмів у забраному атмосферному повітрі, його забирають на рівні, що на 2-3 м вище від найбільш високої точки будівлі турбокомпресором через забірну шахту, тобто для проєктованого виробництва – на висоті ≈ 10 м (висота ферментера – 1,7 метра, висота поверху становить – 6 м, а косий дах будівлі становить ще приблизно 1,5 м).

2. Для очищення повітря від пилу, захисту компресорів від контамінації та зменшення концентрації забруднювачів повітря, його пропускають через фільтри попереднього очищення.

3. Для подолання опору фільтрів на подальших фільтрувальних стадіях та подолання гідравлічного опору при диспергуванні повітря у об'ємі культуральної рідини необхідно підвищити тиск. З цією метою здійснюють стиснення повітря з використанням турбокомпресора до 0,35-0,5 МПа, у результаті чого температура збільшується до 120-250°C та вологовмісту в об'ємній одиниці.

4. Для зниження температури попередньо нагрітого на стадії стискання повітря, використовують водяний теплообмінний апарат. Щоб остаточно

позбутися зайвої вологи, повітря подають у краплевловлювач ресивера, де також зменшуються пульсації руху повітря, котрі здатні чинити негативний вплив на роботу подальших очисних фільтрів. Вологість повітря має складати 60-70%.

5. Для стабілізації температури та тиску повітря підігрівають до 45-50°C у відповідних теплообмінниках. Вологість повітря має складати 50%.

6. Для видалення 98% мікробів з повітря з метою його подачі до ферментеру проводять очистку на головних фільтрах, котрі встановлюються у ферментаційному цеху на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря.

7. Для очищення повітря від контамінантів на 99,9999% його пропускають через індивідуальні фільтри, встановлені безпосередньо на кожному ферментері.

Будова індивідуального фільтру залежить від типу фільтрувального матеріалу, що застосовується. Протягом експлуатаційного процесу фільтрів потрібно проводити їх стерилізацію, котру найдоречніше здійснювати методом нагрівання вологою парою та витримки впродовж певного часу за 125-130°C, після чого фільтрувальний матеріал висушують гарячим повітрям [31].

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Задля забезпечення асептики процесу необхідно регулярно проводити миття та дезінфекцію обладнання. Тому важливим є підбір відповідних засобів, котрі повинні забезпечувати фунгіцидну, бактерицидну та противірусну дію. Наразі на ринку популярності набувають комбіновані мийно-дезінфікуючі засоби, адже їх використання скорочує час санітарної обробки та витрати на миючі засоби. Необхідно також обрати декілька засобів, аби запобігти розвитку резистентних форм мікроорганізмів шляхом чергування дезінфектантів між собою кожні три місяці. Зважаючи на те, що у виробничому процесі використовується обладнання малих об'ємів, миття та

дезінфекція обладнання проводитиметься вручну.

Одним із таких засобів може бути «Фамідез Ендо», котрий має широкий спектр протимікробної дії та може бути використаний для обробки обладнання та приміщень. Основним компонентом даного препарату є ЧАС, що зумовлює його високу розчинність та гарний мийний ефект [35]. Для обробки обладнання можна також застосовувати «Фамідез Форте» на основі альдегідів, що містить інгібітор корозії [36]. З тією ж самою метою можна також використати «Стериокс», в якому в якості діючої речовини використовується надоцтова кислота [37]. Усі перераховані засоби мають широкий спектр дії та дозволені до застосування у фармацевтичній та біотехнологічній промисловості й внесені до Державного реєстру дезінфікуючих засобів [38].

Зважаючи на те, що процес культивування дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* з метою отримання наночастинок срібла відбувається всередині герметичного обладнання, це виключає необхідність дотримання суворої асептики приміщень. Проте з метою підтримки чистоти виробничих ділянок необхідно проводити щоденне та генеральне прибирання, для чого також слід підібрати оптимальні мийно-дезінфекційні засоби, котрі потрібно чергувати між собою кожні три місяці [39]. Для цього оптимальними будуть такі засоби, як «Охivir Excel» та «Праймдез комбі». Усі вищеперераховані засоби мають широкий спектр антимікробної дії, а також дозволені до застосування у фармацевтичній та біотехнологічній промисловості й внесені до Державного реєстру дезінфікуючих засобів [38,40].

Детальніша інформація про мийно-дезінфікуючі засоби, що використовуються для санітарної підготовки виробництва наведена у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Узагальнена характеристика мийно-дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Діючі речовини	Властивості	Об'єкт обробки	Концентрація робочого розчину	Відомості про державну реєстрацію	Джерело
«Фамідез Ендо» (ДезоМарк)	Дідецилметилполі- (оксиетил) амонію пропіонат – 5,63%; Кокоспропілен- діамінгуанідину ацетат – 3,75 %.	Бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні, спороцидні	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,5 %	Засіб внесено до Державного реєстру дезінфікуючих засобів 2020 року, № 68. Дата видачі: 01.04.2020. Термін дії: 01.04.2025.	[35,38]
«Фамідез Форте» (ДезоМарк)	Формальдегід – 7,6%; Глютардіальдегід – 4,5%.	Бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні, спороцидні	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,75 %	Засіб внесено до Державного реєстру дезінфікуючих засобів 2020 року, № 64. Дата видачі: 01.04.2020. Термін дії: 01.04.2025.	[36,38]
«Стериокс» (Baltiachemi)	Надоцтова кислота – 15-20%.	Бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні, спороцидні	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,01 %	Засіб внесено до Державного реєстру дезінфікуючих засобів 2020 року, № 230. Дата видачі: 17.04.2020. Термін дії: 17.04.2025.	[37,38]
«Праймдез комбі» (Праймдез)	N-(3-амінопропіл)- N-додецилпропан- 1,3-діамін – 5,23- 5,77%; Дидецилдиметил- амонію хлорид – 3,15-3,85%.	Бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні, спороцидні	Підлога, стіни, поверхні обладнання, двері, вікна	0,25 %	Засіб внесено до Державного реєстру дезінфікуючих засобів 2021 року, № 69. Дата видачі: 03.03.2021. Термін дії: 03.03.2026.	[40,41]
«Oxivir Excel» (Diversey)	Водень пероксид – 0,36%.	Бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні, спороцидні	Підлога, стіни, поверхні обладнання, двері, вікна	0,25 %	Засіб внесено до Державного реєстру дезінфікуючих засобів 2020 року, № 428. Дата видачі: 02.06.2020. Термін дії: 02.06.2025.	[38,42]

Виробництво наночастинок срібла з використанням *Rhodotorula mucilaginosa* здійснюється упродовж 30 днів та передбачає підготовку наступного обладнання: ферментер об'ємом 30 л, реактор-змішувач для приготування поживного середовища об'ємом 20 л, центрифуга з максимальною ємністю ротора 1,6 л, збірник для деіонізованої води об'ємом 26,5 л, реактор для промивання деіонізованою водою об'ємом 20 л, реактор для біохімічного синтезу об'ємом 30 л, качалки, а також бокс та лабораторне обладнання.

Виробництво здійснюють в наступних приміщеннях: цех виробничого біосинтезу, приміщення з качалками, лабораторія з автоклавами, боксом, термостатами, холодильниками, устаткуванням для здійснення різних типів контролю.

На рис. 5.1 наведено приблизний план приміщення для виробництва наночастинок срібла з використанням дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa*. План враховує габаритні розміри обладнання, відстань між ним (не менше 1 м) та від стін (1-1,5 м).

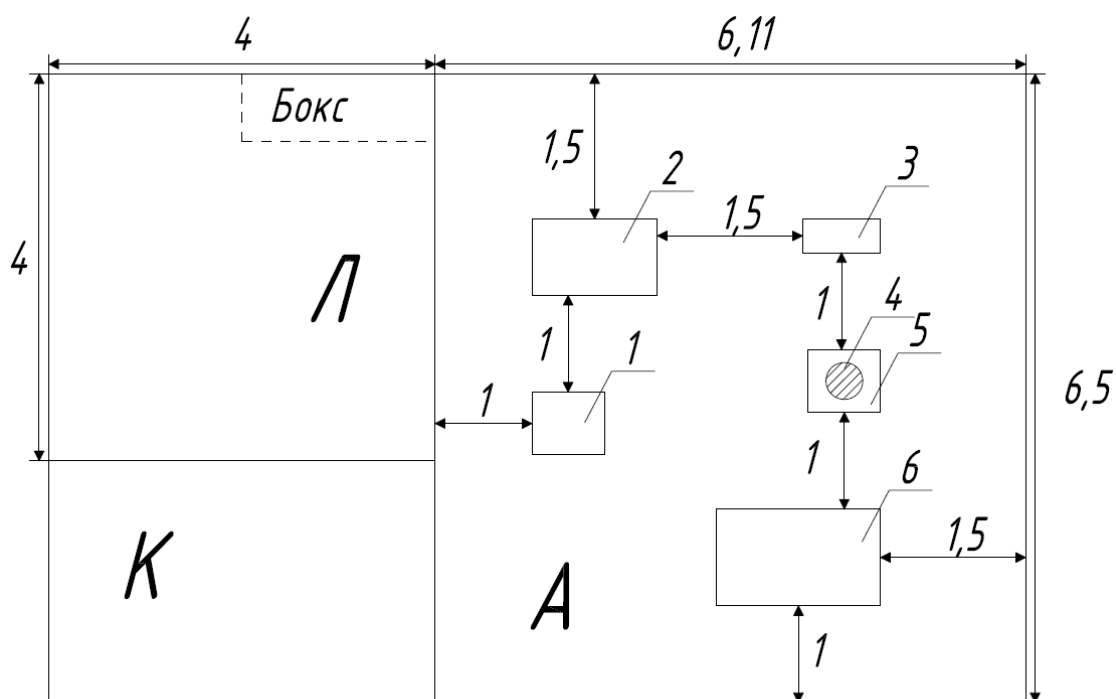


Рис. 5.1. Ескіз плану приміщення виробництва наночастинок срібла з

використанням дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa*

А – цех виробничого біосинтезу та культивування дріжджів (1 – реактор-змішувач для приготування поживного середовища, 2 – ферментер, 3 – центрифуга, 4 – збірник для деіонізованої води, 5 – реактор для промивання деіонізованою водою, 6 – реактор для біосинтезу); Л – лабораторія; К – качалочна.

Габарити основного устаткування наведено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2.

Габарити основного устаткування виробництва наночастинок срібла з використанням *Rhodotorula mucilaginosa*

Устаткування	Об'єм, л	Довжина (L), м	Ширина (W), м	Висота (H), м
Реактор-змішувач для приготування поживного середовища	20	0,75	0,65	2,15
Ферментер	30	1,3	0,79	1,7
Центрифуга	1,6	0,81	0,35	1,17
Збірник для деіонізованої води	26,5	-	0,381	0,533
Реактор для промивання деіонізованою водою	20	0,75	0,65	2,15
Реактор для біосинтезу	30	1,7	1,0	1,45
Всього	128,1	-	-	-

Відповідно до даних табл. 2.2, загальний об'єм обладнання для виробничого культивування дріжджів та біологічного синтезу наночастинок срібла становить 128,1 л.

Для підтримки чистоти виробничих приміщень, підлогу миють щодня, тобто 30 разів. Раз на місяць проводять генеральне прибирання (обробка стін, підлоги, вікон тощо), тобто раз на 30 днів. З метою розрахунку кількості

мийно-дезінфікуючих засобів потрібно розрахувати приблизну площу обробку ними з урахуванням площі підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 6 м. Висота стін для мікробіологічної лабораторії та приміщення з качалками становить по 2,5 м.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить $39,715 \text{ м}^2$ ($6,5 \times 6,11 \text{ м}$), площа стін – $((6,5 \times 6) + (6,11 \times 6)) \times 2 = 151,32 \text{ м}^2$.

Площа підлоги мікробіологічної лабораторії становить 16 м^2 ($4 \times 4 \text{ м}$), площа стін – $(2,5 \times 4) \times 4 = 40 \text{ м}^2$.

Площа підлоги приміщення з качалками становить 10 м^2 ($4 \times 2,5 \text{ м}$), площа стін – $((4 \times 2,5) + (2,5 \times 2,5)) \times 2 = 32,5 \text{ м}^2$.

Загальну площу поверхні обробки мийно-дезінфікуючими засобами наведено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Загальна площа гідтх[жм виробничих приміщень

Приміщення	Підлога, м^2	Стіни, м^2	Разом, м^2
Приміщення виробничого біосинтезу та культивування дріжджів	39,715	151,32	191,035
Лабораторія	16	40	56
Качалочна	10	32,5	42,5
Загальна площа	65,715	223,82	289,535

Кількість виробничих циклів для синтезу наночастинок срібла складає 28. Зважаючи на те, що обладнання миють перед початком кожного циклу, за весь період виробництва буде здійснено складає 29 таких процесів, враховуючи додаткове миття після останнього циклу. В такому випадку загальний об'єм миття складатиме:

$$128,1 \times 29 = 3714,9 \text{ л}$$

Загальні результати розрахунку площі миття та дезінфекції за весь

період наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Загальна площа миття та дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва наночастинок срібла з використанням *Rhodotorula mucilaginosa*

Об'єкт, що миють та дезінфікують	Загальний об'єм (площа) оброблюваного об'єкту, м ³ (м ²)	Загальна кількість процесів санітарної обробки за весь період експлуатації	Загальний об'єм (площа) санітарної обробки за весь період експлуатації, м ³ (м ²)
Устаткування	0,1281	29	3,7149
Підлога	65,715	30	1971,45
Стіни, двері, вікна	223,82	1	223,82

Дані щодо вибору мийно-дезінфікуючих засобів наведено в узагальненій таблиці 5.5.

Таблиця 5.5

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва наночастинок срібла

Назва засобу (діюча речовина)	Об'єкт санітарної обробки	Концентрація робочого розчину, %	Загальний об'єм (площа) санітарної обробки об'єкту за весь період експлуатації, л (м²)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг засобу для санітарної обробки, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна санітарної обробки за весь період експлуатації, грн
Фамідез Ендо (Дідецилметилполі- (оксиетил) амонію пропіонат; кокоспропілен- діамінгуанідину ацетат)	Обладнання	0,5	3,7149	742,98	422	2,11	1567,6878
Фамідез Форте (Формальдегід; глутардіальдегід)	Обладнання	0,75	3,7149	742,98	510	3,825	2841,8985
Стериокс (Надоцтова кислота)	Обладнання	0,01	3,7149	742,98	125	0,0125	9,28725
Праймдез комбі (Суміш ЧАС)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,25	2195,27	219,527	529	1,3225	290,324458
Oxivir Excel (Пероксид водню)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,25	2195,27	219,527	420	1,05	230,50335

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Виходячи з попередньо проведених розрахунків (див. п. 3.4), виробниче культивування *R. mucilaginosa* проходить у ферментері об'ємом 30 л, що містить 14,3 л поживного середовища. Інокулят отримують в один етап: у колбах на качалці.

Для біосинтезу наночастинок срібла дріжджі *R. mucilaginosa* вирощують на середовищі наступного складу (г/л) [8]:

- ❖ Дріжджовий екстракт – 10;
- ❖ Пептон – 20;
- ❖ Глюкоза – 20;

Стерилізації підлягають усі компоненти поживного середовища.

Щоб визначити спосіб приготування розчину нітрату срібла та 6%-го розчину соляної кислоти та мати можливість визначити необхідне для цього устаткування, потрібно розрахувати кількість даних компонентів, що є необхідною для підготовки живильного середовища на кожному етапі технологічного процесу (табл. 5.6.).

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту та особливості підготовки компонентів живильного середовища

Об'єм живильного середовища, л	Компоненти середовища		HCl (6%)		1 М AgNO ₃	
	Вміст, г	Особливість підготовки	Об'єм, мл	Особливість підготовки	Об'єм, мл	Особливість підготовки
1,43	71,5	У колбі 3 л	–	–	–	–
14,3	643,5	У реакторі 22 л	28,6	У колбі 50 мл	322	У колбі 750 мл

Приготування та стерилізація середовища для отримання посівного матеріалу у качалочних колбах

Середовище для вирощування інокуляту у колбах на качалках будемо стерилізувати в автоклаві зважаючи на його малий об'єм (1,287 л). Здійснивши

аналіз складу середовища, його можна умовно поділити на наступні композиції (відповідно до режиму стерилізації):

Композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза, пептон (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Дріжджовий екстракт, глюкоза та пептон (композиція А) мають низьку температуру розкладання, через що для них потрібно забезпечити м'який режим стерилізації. Стерилізацію композиції А здійснюють в автоклаві.

Розрахована кількість складових, що використовуються з метою підготовки поживного середовища для подальшого використання у культивуванні посівного матеріалу, наведена у табл. 5.7:

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації складових середовища для отримання посівного матеріалу в качалочних колбах

Складова поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для підготовки 1430 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Дріжджовий екстракт	10	14,3	А	1430
Пептон	20	28,6		
Глюкоза	20	28,6		
Вода	1430 мл			

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 30 л

Для цієї стадії необхідно 14,3 л поживного середовища. Композиції, їх якісний склад композицій та параметри стерилізації не відрізняються від попередніх. Композицію А заварюють у окремому реакторі-змішувачі та стерилізують у ферментері.

Розрахована кількість складових, що використовуються з метою підготовки поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 30 л, наведена у табл. 5.8:

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації складових середовища для культивування у ферментері

Складова поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для підготовки 12,87 л середовища, г	Композиція	Об’єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	10	128,7	А	12,87
Пептон	20	257,4		
Глюкоза	20	257,4		
Вода	11,44 л		А	12,87
Конденсат	1,43 л			

Приготування розчину нітрату срібла та розчину соляної кислоти

Зважаючи на те, що у середовищі присутні речовини, що здатні спричиняти утворення піни (пептон), а також потреба у інтенсивній подачі повітря, що також може призводити до піноутворення, необхідно використовувати піногасник. Враховуючи, що до базової конфігурації ферментеру входить механічний піногасник, то приготування хімічного піногасника є недоцільним.

Для процесу біосинтезу необхідно довести рН до 4,0, чого можна досягти шляхом додавання 6%-го розчину соляної кислоти. Для встановлення вищезазначеного рівня рН необхідно використати 2 мл HCl на 1 л реакційної суміші. Для виробничого біосинтезу у реакторі об'ємом 30 л потрібно приготувати 28,6 мл соляної кислоти у колбі об'ємом 50 мл.

Необхідно зазначити, що для процесу біосинтезу наночасток срібла

необхідно підготувати 1 М розчин нітрату аргентуму. На один цикл біосинтезу до безклітинного водного екстракту додають AgNO_3 у кількості 1 мМ [8], що в свою чергу становить 1 мл 1 М аргентум нітрату. На весь період виробництва необхідно 322 мл AgNO_3 , приготувати який можна у колба об'ємом 750 мл.

Таким чином, без урахування стадій підготовки інокуляту, технологічна схема містить наступні допоміжні роботи:

- 1) санітарна підготовка виробництва;
- 2) підготовка стерильного повітря для забезпечення аерації;
- 3) приготування 6%-го розчину соляної кислоти для виробничого біосинтезу;
- 4) приготування та стерилізація 1 М розчину AgNO_3 для виробничого біосинтезу.

Окрім основних реакторів для приготування композицій, що встановлені перед ферментерами, у цеху виробничого біосинтезу варто передбачити такі ємності:

- колба об'ємом 50 мл для приготування 6%-го розчину HCl ;
- колба об'ємом 750 мл для приготування 1М розчину AgNO_3 .

5.2. Основні етапи виділення та очищення наночастинок срібла

Для подальшого використання у біологічно активних добавках отримані наночастинок срібла необхідно очистити від домішок та залишків невідновленої солі. Для цього використовують метод центрифугування з потрібним промиванням дистильованою водою та подальшою сушкою з використанням вакуумної або ліофільної сушарки [12,43,44]. Умови та параметри виділення наночастинок срібла наведена у таблиці 5.9.

Таблиця 5.9.

**Порівняльна характеристика умов виділення та очищення
наночастинок срібла**

Розміри отриманих наночастинок, нм	Параметри центрифугування	Тип води для промивання	Кількість промивань	Вид сушіння	Джерело
44-64	12000 об/хв, 20 хв	деіонізована	3	сублімаційне	43
20-80	17000 об/хв, 20 хв	деіонізована	-	сублімаційне	44
0-15	10000 об/хв, 20 хв	деіонізована	3	вакуумне	12

Зважаючи на те, що початкові етапи (центрифугування та промивання дистилятом) застосовуються всюди без істотних відмінностей за принципом, варто порівняти лише апарат для сушіння, котрий буде найбільш оптимальним при отриманні очищених наночастинок срібла.

Сублімаційне висушування одним з найбільш ефективних методів для видалення вологи з термолабільних біологічних об'єктів, за якого молекулярна структура матеріалу майже не зазнає змін. До того ж отриманим речовинам характерні висока дисперсність та пористість, чого важко досягти при звичайному сушінні, за якого втрачається значна кількість об'єму матеріалу. Використання сублімаційних сушарок за теплоенергетичними показниками приблизно рівноцінне сушінню за атмосферного тиску, проте побудова сушарки набагато дорожчою [45].

Використання вакуум-сушильних шаф у процесі сушіння отриманих наночастинок срібла має ряд переваг перед сублімаційними сушарками. Вони також призначені для видалення вологи з термолабільних продуктів, проте процес відбувається в умовах кімнатної або підвищеної температури. Дані апарати використовуються переважно у малотонажних виробництвах. Сушіння проводять періодично, що задовольняє вимоги виробництва наночастинок срібла, адже усі інші процеси також проходять періодично [45].

Зважаючи на вищезазначені фактори, для виділення, концентрування та очищення отриманих наночастинок срібла обираємо метод центрифугування з подальшим промиванням деіонізованою водою та сушінням в використанні вакуум-сушильної шафи [12].

5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації виділення та очищення наночастинок срібла

Для центрифугування отриманої на стадії біосинтезу наночастинок срібла реакційної суміші оптимально використати ультрацентрифугу CENHFR-6L з частотою обертів до 10000 об/хв, що задовольняє раніше згадані умови для процесу виділення та очищення отриманих срібних наночастинок. Дана центрифуга також обладнана рефрижератором для контролю температури у процесі осадження [46].

Для цього реакційну суміш, що містить наночастинок срібла, завантажують до ультрацентрифуги, після чого починають процес центрифугування за 10000 об/хв протягом 20 хв. Після даного процесу супернатант зливають, а осад передають на стадію промивання [12].

Для промивання наночастинок срібла деіонізованою водою необхідно встановити реактор SS-20L об'ємом 20 л. Даний апарат вироблений з нержавіючої сталі марки SS-304 та оснащений мішалкою з частотою обертів до 600 об/хв [47].



Рис. 5.2. Реактор SS-20L

Після досягнення однорідності суміші її знову направляють до ультрацентрифуги. Дану операцію повторюють тричі з урахуванням першого центрифугування, після чого наночастинки срібла необхідно направити на стадію сушіння [12].

З метою сушіння наночастинок срібла необхідно встановити вакуум-сушильну шафу LabExpert 15 з обсягом нагрівальної камери 15 л. Даний апарат для сушіння оснащений цифровим контролером OptiControl та має робочий діапазон температур від +10 до +300°C [48].



Рис. 5.3. Вакуум-сушильна шафа LabExpert 15

Осад після останнього центрифугування, що містить наночастинки срібла, завантажують на полиці, створюють вакуум та починають обігрівання шафи. Процес сушіння наночастинок триває 6 годин за температури 80°C. По закінченню процесу сушіння отримані наночастинки можна у подальшому використовувати у якості діючої речовини у біологічно активних добавках.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу наночастинок срібла

Позиція	Назва	Кількість	Характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрязабірник (Kratki), виготовлений з нержавіючої сталі, обладнаний сіткою для запобігання потрапляння дрібних часток (d=150 мм) [49].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Повітряний фільтр ФПГ. Виробник: «Технофільтр». Фільтрувальний матеріал: поліестер/сітка оцинкована; продуктивність: 600 м³/год; E=80-90%; габаритні розміри, мм: 287x287x48 [50].
К-3	Компресор	1	Компресор серії LFX («Atlas Copco»). Продуктивність: 1,02 л/с; робочий тиск: 4 – 10 бар; габаритні розміри, мм: 520x340x490 [51].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач повітря рефрижераторного типу COMPAIR-F2C («KOMPRESORMASH-SERVIS»). Продуктивність: 11 м³/год; габарити, мм: 360x500x460; [52].
РС-5	Ресивер	1	Ресивер («KOMPRESORMASH-SERVIS»). Об'єм, л: 200; макс. тиск: 12 бар [53].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний повітрянагрівач серії VBC ("Systemair"), max температура – 150°C, max робочий тиск – 1,6 МПа [54].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Кишеньковий фільтр класу F9 («New filter»). Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; E>95% [55].
Ф-8	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр повітряний SPF-005. Фільтрувальний матеріал: боросилікатне волокно; E = 99,999 % [56].

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 6 Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу		Літ.	Арк.	Акц.
Консульт.								54	2
Керівник		Скроцька О.І.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Зав.каф.		Стабніков В.П.							

Ф-8	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр повітряний <i>SPF-005</i> . Фільтрувальний матеріал: боросилікатне волокно; $E = 99,999\%$ [56].
Д-9	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор FL-500 («Foyer»); діапазон зважування – 1-500 г; точність зважування – 1 г; напруга = 220 В; потужність = 0,18 кВт [57].
Р-10	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор SS-20L об'ємом 20 л (Shanghai Yuhua). Матеріал: нержавіюча сталь SS304; оснащений сорочкою та мішалкою (0-600 об/хв); габаритні розміри, мм: 750x650x2150 [47].
Н-11 Н-14 Н-17	Насос	3	Перистальтичний насос KRONOS 65 FM25 («Seko»), продуктивність 25 л/год; тиск – 0,1 бар [58]
ФР-12	Ферментер	1	Ферментер BLBIO-30-SJA-AUTO об'ємом 30 л («BLBIO»). Матеріал: нержавіюча сталь; укомплектований мішалкою з регульованою швидкістю перемішування: 70-1000 об/хв; із датчиками вимірювання pH, pO_2 , температури, манометром, піногасником; габаритні розміри, мм: 1300x790x1700 [59].
Ц-13	Центрифуга	1	Проточна центрифуга Unifuge Pilot, макс. ємність ротора – 1,6 л; швидкість потоку – 0,1-4 л/хв; габаритні розміри, мм: 350x810x1170 [60].
З-15	Збірник для деіонізованої води	1	Збірник ACE-ROTO MOLD на 7 галонів з повним дренажним конусом в нижній частині резервуару. Максимальна ємність – 26,5 л; габаритні розміри, мм: 381x533 [61].
Р-16	Реактор для промивання деіонізованою водою	1	Реактор SS-20L об'ємом 20 л (Shanghai Yuhua). Матеріал: нержавіюча сталь SS304; оснащений сорочкою та мішалкою (0-600 об/хв); габаритні розміри, мм: 750x650x2150 [47].
Р-18	Реактор для біосинтезу	1	Мобільний реактор РСГ-30 з нержавіючої сталі марки AISI 316 L, загальний об'єм 30 л з турбінною мішалкою; робочий тиск – (-0,7) – 2 бар; діапазон температур – 20-95°C . Габаритні розміри, мм: 1700x1000x1450. [62]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема біосинтезу наночастинок срібла допоміжні роботи («ДР» - підготовка повітря для аерації, приготування та стерилізація поживних середовищ та 1 М розчину AgNO_3) та технологічний процес («ТП» - підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування *R. mucilaginosa*, отримання безклітинного екстракту та біосинтез наночастинок срібла).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

До того як приступити до роботи персонал повинен пройти обов'язкове навчання та інструктаж відповідно до своїх обов'язків, місця та напрямку роботи. Передбачено також систематичне підвищення кваліфікації залучених до технологічного процесу працівників.

ДР 1.2. Приготування мийно-дезінфікуючих засобів

ДР 1.2.1. Приготування розчину «Фамідез Ендо»

З метою подальшого використання для миття та дезінфекції обладнання та комунікацій готують робочий розчин мийно-дезінфікуючого засобу «Фамідез Ендо». Для цього у відро об'ємом 10 л наливають 9950 мл води питної та розчиняють у ній 50 мл засобу «Фамідез Ендо». Відро накривають кришкою. Отриманий розчин поступає на стадію ДР 1.4.1.

ДР 1.2.2. Приготування розчину «Праймдез комбі»

З метою подальшого використання для миття та дезінфекції приміщень готують робочий розчин мийно-дезінфікуючого засобу «Праймдез комбі». Для цього у відро об'ємом 10 л наливають 9975 мл води питної та розчиняють у ній 25 мл засобу «Праймдез комбі». Відро накривають кришкою. Отриманий розчин поступає на стадію ДР 1.3.

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	Літ.	Арк.	Акресів	
Консульт.							56	7	
Керівник		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Зав.каф.		Стабніков В.П.							

ДР 1.3. Підготовка приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання здійснюють кожного дня, воно полягає у митті підлоги шляхом протирання поверхні або розпилення мийно-дезінфікуючого розчину «Праймдез комбі» з використанням пристрою з турбулюючими аерозольними насадками.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання здійснюють раз на місяць, воно полягає у обробці стін, підлоги, вікон, стелі та інших поверхонь шляхом протирання поверхні або розпилення мийно-дезінфікуючого розчину «Праймдез комбі» з використанням пристрою з турбулюючими аерозольними насадками.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття та дезінфекція

Ємнісне обладнання заповнюють розчином мийно-дезінфікуючого засобу «Фамідез Ендо» до половини об'єму обладнання та вмикають перемішуючий пристрій. По завершенню миття воду зливають в каналізацію.

ДР 1.4.2. Перевірка на герметичність

До герметично закритого обладнання підводять стиснене повітря з метою перевірки на герметичність. Перевірка триває й годину. У разі відсутності проблем з герметизацією обладнання можна передавати на стадію стерилізації.

ДР 1.4.3. Стерилізація

До герметичного обладнання підводять пару під тиском з температурою 125-130°C та витримують 1 годину. Простерилізоване обладнання можна далі використовувати у технологічному процесі.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають з використанням вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1) у найвищій точці (на висоті ≈ 10 м).

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Через тканинний фільтр грубого очищення (Ф-2) пропускають аераційне повітря з метою затримання на тканинному матеріалі частинок з діаметром 50 мкм і більше ($E=80-90\%$).

ДР 2.3. Стиснення повітря

З метою подолання гідравлічного тиску стовпа рідини у ферментері та інших опорів проводиться стиснення повітря у компресорі (К-3) до $P = 0,35$ МПа, повітря при цьому нагрівається до $120-250^{\circ}\text{C}$.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Отримане стиснене повітря охолоджують у охолоджуючому теплообміннику (Т-4) до температури «точки роси» ($25-30^{\circ}\text{C}$). У краплевловлювачі ресивера (РС-5) відбувається видалення зайвої вологи. У ньому також усуваються пульсації руху повітря, що можуть контрпродуктивно впливати на ефективність подальших фільтрів очистки повітря. Вологість повітря має складати $60-70\%$.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

З метою стабілізації тиску та температури повітря далі підігрівають до температури 50°C у теплообміннику-нагрівачі (Т-6). Вологість повітря має складати 50% .

ДР 2.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Для отримання повітря, очищеного на 95% , його пропускають через головний фільтр очистки (Ф-7).

ДР 2.7. Очищення повітря у індивідуальному фільтрі

Далі, маючи за мету забезпечення очищення повітря на $99,999\%$, воно подається до індивідуального фільтра (Ф-8), котрий встановлюється безпосередньо перед ферментером.

ДР 3. Приготування розчину соляної кислоти

ДР 3.1. Приготування розчину соляної кислоти для виробничого біосинтезу

У колбу об'ємом 50 мл вносять 5,72 мл соляної кислоти концентрацією 30% та доводять об'єм до 28,6 мл деіонізованою водою. Приготований розчин надходить до стадії ТП 7.5.

ДР 4. Приготування та стерилізація розчину нітрату срібла

ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину нітрату срібла для біосинтезу

На технічних вагах зважують 54,7 г нітрату срібла та переносять у колбу об'ємом 750 мл, після чого доводять об'єм до 322 мл деіонізованою водою та перемішують. Отриманий розчин стерилізують автоклавуванням протягом 40 хв за 131°C. Приготований розчин надходить до стадії ТП 7.5.

ДР 5. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування інокуляту в колбах

На даному етапі необхідно 1430 мл поживного середовища. Розрахована кількість складових, що використовуються з метою підготовки поживного середовища для подальшого використання у культивуванні посівного матеріалу наведена у табл. 5.7 (розділ 5).

На технічних вагах зважують 14,3 г глюкози, 28,6 г пептону та 28,6 г дріжджового екстракту, поміщають у колбу об'ємом 3 л, доводять об'єм до 1430 мл питною водою, перемішують. Отримане середовище стерилізують автоклавуванням протягом 30 хв за 112°C. Приготоване середовище надходить до стадії ТП 6.4.

ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 30 л

На даному етапі необхідно отримати 12,87 л поживного середовища. Розрахована кількість складових, що використовуються з метою підготовки поживного середовища для подальшого використання у культивуванні біологічного агента у ферментері об'ємом 30 л наведена у табл. 5.8 (розділ 5).

За допомогою вагового дозатора (Д-9) вносять у реактор-змішувач (Р-

10) об'ємом 15 л 128,7 г глюкози, 257,4 г пептону та 257,4 г дріжджового екстракту, доводять об'єм до 12,87 л питною водою і перемішують. Отримане поживне середовище за допомогою насосу (Н-11) до ферментера (ФР-12) об'ємом 30 л та стерилізують подачею гострої пари у реактор і у сорочку протягом 30 хв за 112°C. Приготоване середовище надходить до стадії ТП 7.1.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *R. mucilaginosa* зберігають у пробірках зі скошеним YEPD агаром в холодильнику при 4°C. Пересіви здійснюють кожні 4-6 місяців. Усі роботи з колекційною культурою проводять у строго асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури

На чашки Петрі з агаризованим середовищем YEPD за допомогою бактеріологічної петлі розсівають колекційну культуру *R. mucilaginosa* до ізольованих колоній та вирощують протягом 48 год за температури 27°C.

ТП 6.3. Вирощування інокуляту в пробірках на агаризованому середовищі

Ізольовані колонії, отримані на стадії ТП 6.2, пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем YEPD (одну пробірку засівають однією ізольованою колонією). Тривалість вирощування – 24 години, температура – 27°C.

ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В умовах асептики із колби з стерильним поживним середовищем (від ТП 6.1) об'ємом 3 л розливають по 143 мл у 10 стерильних качалочних колб об'ємом по 750 мл кожна.

У пробірку з робочою культурою *R. mucilaginosa*, вирощену на агаризованому середовищі YEPD (від ТП 6.3), вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, відбирають клітинну суспензію піпеткою та вносять у колби з середовищем. Одну колбу засівають суспензією з одної

пробірки.

По завершенню процесу культивування дріжджів у колбах на качалках протягом 20 год при рН 5,5, 150 об/хв та 27°C культуральну рідину з колб за допомогою факела переносять у ферментер об'ємом 30 л (ФР-12).

Мікробіологічний аналіз культуральної рідини проводиться по завершенню процесу вирощування. У процесі контролюють вміст біомаси, глюкози та пептону.

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 л

Для виробничого культивування у ферментер (ФР-12) в умовах асептики через штуцер при горінні факела вносять посівний матеріал (від ТП 6.4).

Вирощування дріжджів у виробничому ферментері триває 20 год при рН 5,5 та 27°C. Після цього культуральну рідину перекачують перистальтичним насосом (Н-13) до центрифуги (Ц-14).

Через кожні 4 год здійснюють мікробіологічний контроль культуральної рідини, а також контролюють вміст біомаси, глюкози та пептону.

ТП 7.2. Центрифугування культуральної рідини

З ферментера (ФР-12) культуральну рідину у кількості 14,3 л подають до проточної центрифуги (Ц-13) за допомогою перистальтичного насоса, що входить до її комплектації. Час центрифугування складає 20 хв при 4000 об/хв. Супернатант зливають, а біомасу за допомогою перистальтичного насосу (Н-14) подають у збірник для промивки деіонізованою водою.

ТП 7.3. Промивання деіонізованою водою

Із збірника для зберігання деіонізованої води (З-15) самоплином подають деіонізат до збірника для промивання (Р-16), у який попередньо було подано біомасу, отриману після центрифугування. Після перемішування та досягнення однорідності рідини, за допомогою перистальтичного насосу (Н-17) її перекачують у реактор для біосинтезу (до ТП 7.4).

ТП 7.4. Інактивація біомаси дріжджів

Отриману на стадії 5.3 суміш у кількості 14,3 л з збірника для промивки (З-15) за допомогою перистальтичного насоса (Н-17) перекачують до реактору біосинтезу (Р-18) та підвищують температуру до 120°C. Процес триває 15 хвилин, і далі суміш охолоджують до 30°C шляхом подачі холодної води до сорочки реактора.

ТП 7.5. Виробничий біосинтез наночастинок срібла

В асептичних умовах через штуцер при горінні факелу вносять 28,6 мл 6%-го розчину HCl (від ДР 3.1) та 14,3 мл розчину нітрату аргентуму до кінцевої концентрації 1 мМ (від ДР 4.1). Біосинтез наночастинок срібла триває 1 годину при 30°C та режиму перемішування 150 об/хв.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом ферментаційного процесу кожні 5 годин відбирають проби культуральної рідини з колб та ферментера для здійснення мікробіологічного контролю, а також визначення рівню біомаси, концентрації джерел вуглецю та азоту. Також упродовж процесу кожні 0,5 годин здійснюють відбір проби реакційної суміші, аби визначити ступінь біоредукції срібла та формування наночастинок.

8.1. Мікробіологічний контроль

Відсутність сторонньої мікробіоти контролюють прямим висівом на агаризовані поживні середовища та мікроскопуванням.

Прямий висів на агаризовані поживні середовища. На чашки Петрі з МПА (виявлення бактерій) та ГКА або СА (виявлення грибів та дріжджів) розсівають культуральну рідину. Далі 5 діб інкубують чашки з МПА за 28-30°C, а чашки з ГКА та СА – за 24-26°C, після чого розглядають їх на предмет сторонньої мікрофлори [63].

Мікроскопіювання. Мікроскопіювання проводиться у світловому мікроскопі методом «роздавленої краплі». На предметне скло з дотриманням умов асептики стерильною петлею наносять невелику краплю культуральної рідини та накривають його предметним скельцем. Надлишок рідини слід видалити фільтрувальним папером [63].

В полі зору мікроскопу маємо спостерігати типові для *Rhodotorula mucilaginosa* клітини (рис. 8.1). Вони мають яйцеподібну або еліпсоподібну форму та розташовуються поодинокі або попарно. Клітини розміром 1,5-4×4-12 мкм, утворюють бластоконідії, мають невелику полісахаридну капсулу, псевдоміцелій не утворюють [23,22]. Якщо в полі зору мікроскопу видно клітини, які характеризуються іншими морфологічними ознаками, то це свідчить про наявність сторонньої мікрофлори.

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 8 Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акцизів	
Консульт.								63	10
Керівник		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Зав.каф.		Стадніков В.П.							

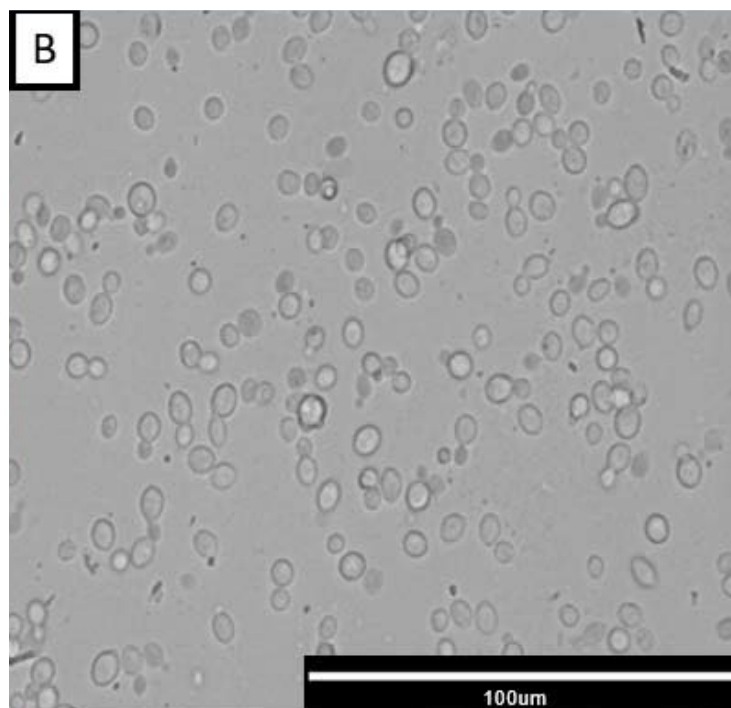


Рис. 8.1. Зображення клітин *R. mucilaginosa* у світловому мікроскопі [22]

8.2. Показники росту

8.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають ваговим методом. Для вимірювання концентрації біомаси відбирають 40 мл культуральної рідини, двічі промивають дистильованою водою та центрифугують при 12,096 g протягом 10 хвилин при температурі 20°C. Концентрацію біомаси обраховували шляхом висушування при 60°C до досягнення постійної маси, після чого її зважували [64].

8.2.2. Концентрація джерела вуглецю

Концентрацію джерела вуглецю – глюкози – визначають за допомогою глюкозооксидазного методу. Кількісне визначення глюкози глюкозооксидазним методом базується на окисненні глюкози до глюконової кислоти, під час чого утворюється пероксид водню. Останній у присутності пероксидази утворює хінонімін у результаті реакції H_2O_2 з фенолом та 4-амінофеназолом. Продукт реакції має червоно-фіолетове забарвлення, чия інтенсивність пропорційна концентрації глюкози [65].

Культуральну рідину центрифугують 10-15 хв при 3000 об/хв. Далі відбирають супернатант, до якого додають глюкозооксидазу та пероксидазу,

фізіологічний розчин та розчин K_2HPO_4 . Дану суміш ретельно перемішують та 20 хв витримують за температури 18-25°C. Після цього вимірюють оптичну щільність калібрувальної та дослідної проби проти холостої при довжині хвилі 500-550 нм та товщині кювети 5-10 мм. Концентрація глюкози розраховується за формулою [65]:

$$C = \frac{10 \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}}$$

C – Концентрація глюкози в дослідній пробі, г/л;

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, г/л;

$E_{\text{досл}}$ = оптична густина дослідної проби, од. опт. густини;

$E_{\text{кал}}$ = оптична густина калібрувальної проби, од. опт. густини.

8.2.3. Концентрація джерела азоту

Оскільки як джерело азоту у середовищі використовується пептон, який складається в основному з білків, то доцільно застосувати метод біуретової реакції для визначення загального білка. Кількісне визначення білка за біуретовою реакцією засноване на реакції протеїнів у лужному середовищі з сульфатом міді. У результаті такої реакції з'являється фіолетове забарвлення, чия інтенсивність визначається з використанням фотоколориметра та прямо пропорційна кількості білків у розчині [66].

Для підготовки проби до аналізу здійснюють центрифугування культуральної рідини при 3000 об/хв протягом 20 хв. Для кількісного аналізу в першу пробірку вносять 0,1 мл дистилату (контроль), в другу таку ж кількість стандартного розчину білка (50 г/л), в решту – по 0,1 мл супернатанту. Далі у кожен пробірку додають по 5 мл біуретового реактиву, перемішують та витримують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Оптичну щільність калібрувальної або дослідної проби проти холостої вимірюють при довжині хвилі 540-560 нм. Концентрація загального білка розраховується за формулою [67]:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 50$$

C – концентрація загального білка в дослідній пробі, г/л;

$E_{\text{дос}}$ – оптична густина дослідної проби, од. опт. густини;

$E_{\text{кал}}$ – оптична густина калібрувальної проби, од. опт. густини;

50 – концентрація загального білка в калібрувальному розчині, г/л.

8.3. Характеристика цільового продукту (наночастинок срібла)

Отримані наночастинки срібла характеризують шляхом вимірювання спектрів з використанням спектрофотометра, їх розміри та форму визначають за допомогою наносайзера та трансмісійної електронної мікроскопії.

8.3.1. Спектрофотометричний аналіз наночастинок срібла

Для підтвердження синтезу наночастинок срібла аналізували спектри поглинання світла за допомогою UV-Vis-спектрофотометра (Thermo Scientific GENESYS™ 10 s). Для проведення аналізу 4 мл дистильованої води вносять у кювету та встановлюють спектр контролю. Потім 4 мл реакційної суміші поміщають у другу кювету, після чого переносять у спектрофотометр до лунки для зразка. Вимірювання проводять у діапазоні довжин хвиль 200-700 нм та пропускній здатності 1,8 нм, використовуючи лампу Xenon Flash Lamp. У разі наявності у розчині наночастинок срібла можна спостерігати на графіку характерний пік при 420 нм [12].

8.3.2. Вимірювання на наносайзері

Для визначення розміру та зета-потенціалу наночастинок срібла використовують метод динамічного розсіювання світла. Для цього застосовують наносайзер Zetasizer Nano ZS. Для проведення аналізу 1,5 мл суспензії наночастинок срібла вносять у стандартну макро-кювету. Пропускна здатність 10 нм. Температура підтримувалась на рівні 25°C у нейтральному середовищі, кут розсіювання світла складав 173°. Експеримент проводять тричі. Для наночастинок срібла використовувався рефрактометричний індекс 1,07 та значення абсорбції 0,01 [68].

8.3.3. Трансмісійна електронна мікроскопія

Перед операцією наночастинки срібла очищали шляхом

центрифугування суспензії при 10000 об/хв протягом 20 хв на ультрацентрифузі HIMAC CS150NX. Супернатант зливають, а отриманий осад тричі промивають деіонізованою водою та висушують у ексикаторі [12].

Для визначення розміру та форми наночастинок срібла використовують метод трансмісійної електронної мікроскопії. Для цього застосовують ТЕМ мікроскоп JEOL 1200EX з напругою 100 кВ. Препарати для дослідження готували шляхом нанесення на мідні сітки, покриті суцільною вуглецевою плівкою, 5 мкл суспензії наночастинок срібла. Після цього чекали випарення вологи при кімнатній температурі. Середній діаметр та розподіл розмірів наночастинок срібла визначали шляхом підрахування мінімум 30 наночастинок з кожної ТЕМ мікрофотографії [12].

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю біосинтезу наночастинок срібла

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і параметри для визначення	Засоби та методи для здійснення контролю	Регулярність контролю та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
К _т , К _х 1.2.1 <i>Приготування розчину «Фамідез Ендо»</i>	Робочий розчин «Фамідез Ендо» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Під час приготування розчину	$C_x = 0,5\%$
К _т , К _х 1.2.2 <i>Приготування розчину «Праймдез комбі»</i>	Робочий розчин «Праймдез комбі» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Під час приготування розчину	$C_x = 0,25\%$
К _т , К _м 1.3.1 <i>Щоденне прибирання</i>	Виробниче приміщення Чистота, стерильність	Мікробіологічний контроль	Після закінчення прибирання	Відсутність забруднення $KYO < 800 \text{ см}^2$
К _т , К _м 1.3.2 <i>Генеральне прибирання</i>	Виробниче приміщення Чистота, стерильність	Мікробіологічний контроль	Після закінчення прибирання	Відсутність забруднення $KYO < 300 \text{ см}^2$
К _т , К _м 1.4.1 <i>Миття та дезінфекція</i>	Обладнання та комунікації Чистота, об'єм заповнення обладнання, стерильність	Мікробіологічний контроль	Після закінчення прибирання, під час заповнення обладнання	Відсутність механічного забруднення, мікробіоти Об'єм розчину не більше половини об'єму обладнання
К _т 1.4.2 <i>Перевірка на герметичність</i>	Обладнання та комунікації Герметичність, тиск, час	Манометр, годинник	Після закінчення процесу миття та герметизації обладнання	Відсутність негерметичності обладнання $P = 0,25 \text{ МПа}$ $\tau = 1 \text{ год}$
К _т 1.4.3 <i>Стерилізація</i>	Обладнання та комунікації Температура, час	Термометр, годинник	Після закінчення перевірки на герметичність	$t = 120-250^\circ\text{C}$ $\tau = 1 \text{ год}$

Продовження табл. 8.1

К _т 2.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрозабірник Висота повітрязабору	-	При купівлі та у процесі встановлення	H = 10 м
К _т 2.2 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часток</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після очищення повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80-90% Тиск згідно паспорту
К _т 2.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснуте повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	По закінченні компресування повітря	P = 0,35-0,5 МПа t = 120-250°C
К _т 2.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Повітря, яке охолодили Температура, вміст вологи	Термометр, психрометр	По закінченню процесу охолодження і видалення вологи	t = 25-30°C W = 60-70%
К _т 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Повітря, яке нагріли Температура, вміст вологи	Термометр, психрометр	По закінченню процесу нагрівання	t = 50°C W = 50%
К _т 2.6 <i>Очищення повітря у головному фільтрі</i>	Повітря, яке очистили Ступінь очистки	Паспорт фільтра	По закінченні процесу очистки повітря у головному фільтрі	E = 95%
К _т 2.7 <i>Очищення повітря у індивідуальному у фільтрі</i>	Повітря, яке очистили Ступінь очистки	Паспорт фільтра	По закінченні процесу очистки повітря у індивідуальному фільтрі	E = 99,999%
К _т , К _х 3.1 <i>Приготування та стерилізація розчину нітрату срібла</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Фізико-хімічний метод	Концентрацію визначають після приготування розчину	C = 6%

Продовження табл. 8.1

К _т , К _х , К _м 4.1 <i>Приготування та стерилізація розчину нітрату срібла</i>	Розчин нітрату срібла Концентрація, температура, час, стерильність, тиск	Фізико-хімічний метод, термометр, годинник, мікробіологічний контроль, манометр	Концентрацію визначають після приготування розчину; час, температура та тиск визначають постійно в процесі стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 1M t = 131°C τ = 40 хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
К _т , К _м 5.1, 5.2 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування інокуляту в колбах та виробничого культивування у ферментері об'ємом 30 л</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Час, температуру та тиск визначають безперервно у процесі стерилізації; мікробіологічний контроль здійснюють по завершенню стерилізації	τ = 30 хв t = 112°C P = 0,05 МПа Відсутність мікробіоти
К _т , К _м 6.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Температура, мікробіологічна чистота	Датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль здійснюється кожні 10-12 місяців	t = 4°C Відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 6.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> на чашках Петрі Температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та час визначаються безперервно при культивуванні, мікробіологічний контроль здійснюється після культивування	t = 27°C τ = 48 год Відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 8.1

К _т , К _м 6.3 <i>Вирощування інокуляту в пробірках на агаризованому середовищі</i>	Робоча культура <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> у пробірках Температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та час визначаються безперервно при культивуванні, мікробіологічний контроль здійснюється після культивування	t = 27°C τ = 48 год Відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 6.4 <i>Вирощування інокуляту в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал Температура, час, швидкість перемішування, концентрація біомаси, рівень рН, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура, рН, час та частота обертів визначаються безперервно при культивуванні, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль здійснюються після культивування	t = 27°C τ = 24 год w = 150 об/хв рН = 5,5 C ₆ = 1,64 г/л Відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м , К _х 7.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 л</i>	Культуральна рідина Температура, час, рівень рН, концентрація розчиненого кисню, піноутворення, концентрація біомаси, концентрація глюкози, концентрація пептону, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, датчик рН, датчик рО ₂ , центрифуга, електронні ваги, фотоколориметр, ротаметр, мікробіологічний контроль	Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, піноутворення та частота обертів визначаються автоматично при культивуванні, визначення концентрації біомаси, глюкози й пептону та мікробіологічний контроль здійснюються кожні 5 годин і після культивування	t = 27°C τ = 20 год w = 150 об/хв рН = 5,5 рО ₂ = 20-30% C ₆ = 1,64 г/л Відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 8.1

К _т 7.2 <i>Центрифугування культуральної рідини</i>	Культуральна рідина Час, частота обертів	Годинник, ротаметр	Час та частота обертів визначаються автоматично під час центрифугування	$\tau = 20$ хв $w = 4000$ об/хв
К _т , К _м 7.3 <i>Промивання деіонізованою водою</i>	Реакційна суміш Однорідність суміші, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль	Однорідність рідини перевіряється візуально, мікробіологічний контроль здійснюється після промивання	Однорідність Відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _м 7.4 <i>Інактивація біомаси дріжджів</i>	Реакційна суміш Температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та час визначаються автоматично під час інактивації, мікробіологічний контроль здійснюється після промивання	$t = 120^{\circ}\text{C}$ $\tau = 15$ хв Відсутність сторонньої мікробіоти
К _т , К _х , К _м 7.5 <i>Виробничий біосинтез наночастинок срібла</i>	Реакційна суміш Температура, час, рівень рН, швидкість перемішування, формування наночастинок, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, датчик рН, ротаметр, центрифуга, спектрофотометр, наносайзер, ТЕМ мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура, час та частота обертів визначаються автоматично під час інкубування, мікробіологічний контроль та контроль формування наночастинок здійснюють кожні 0,5 годин і після інкубування	$t = 30^{\circ}\text{C}$ $\tau = 1$ год $\text{pH} = 4$ $w = 150$ об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

У процесі біосинтезу наночастинок срібла *Rhodotorula mucilaginosa* утворюються рідкі відходи, до яких відносяться залишки культуральної рідини та мийно-дезінфікуючих розчинів. Зважаючи на можливість їх шкідливого впливу на навколишнє середовище, необхідно встановити систему, що дозволить знешкодити такі рідини.

На території біотехнологічних виробництв утворюються три види стічних вод: виробничі, побутові й атмосферні.

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод становлять:

$$Q_e = q_e \cdot n = 17400 \cdot 14,3 = 248820 \text{ л/рік} = 682 \text{ л/добу}$$

де q_e – норма відведення води в л на одиницю продукції, що підприємство виробляє (орієнтовно приймаємо 17400 л/кг); n – кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (14,3 л).

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 3 = 75 \text{ л/зміну}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху 25 л/зм люд); N – кількість працівників у зміні.

За добу в середньому матимемо наступну витрату побутових стічних вод:

$$Q_n = Q_n \cdot N_{зм} = 75 \cdot 3 = 225 \text{ л/добу}$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу (3).

За добу в середньому матимемо наступну витрату атмосферних стічних вод:

$$Q_a = Q_n/5 = 225/5 = 45 \text{ л/добу}$$

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 9 Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва			Літ.	Арк.	Акредит.	
Консульт.										73	6
Керівник		Скороцька О.І.		Кафедра БТМ							
Н. Контр.											
Зав.каф.		Стадніков В.П.									

Таким чином, розрахуємо загальну витрату утворюваних на підприємстві стічних вод:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 682 + 225 + 45 = 952 \text{ л/добу}$$

Таку кількість рідких відходів можна знешкодити за допомогою системи зворотного осмосу Ecosoft MO-1 моделі MO11XLWE (ECOSOFT, Україна) продуктивністю 1200 л/добу. У процесі очищення стічних вод за допомогою зворотного осмосу їх під тиском подають на спеціальну зворотньоосмотичну полімерну мембрану, при чому чиста вода проходить далі, а забруднювачі ефективно затримуються [69]. Перевагою є те, що за допомогою даного методу з'являється можливість видалення та утилізації низькомолекулярних речовин [70]. Автоматика установки дозволяє забезпечити електричний захист насосу від сухого ходу, мембран від високого тиску, а також уможлиблює виконання гідравлічної промивки мембран. Система оснащена передфільтром Big Blue 20 з діаметром пор 5 мкм та контролером [71].



Рис. 9.1. Система зворотного осмосу ECOSOFT MO11XLWE

Незважаючи на переваги методу зворотного осмосу, його недоліком є потреба у проведенні попереднього очищення стоків [70]. Беручи до уваги

наявність у комплектації системи передфільтру з пропускною здатністю 5 мкм [71], доцільним буде встановити фільтр MPF моделі MPF1811AG2P10NBP01 (MP Filtri, Італія), діаметр пор якого складає 10 мкм [72]. Даний крок дозволить зменшити навантаження на передфільтр, що зробить можливим збільшити період його експлуатації. З тією ж метою необхідно установити гідравлічний зливний фільтр моделі MPF0301AG1P25NBP01 (MP Filtri, Італія), котрий здатен затримувати частки діаметром більше 25 мкм. У якості матеріалу фільтроелементу у даних пристроях використовується мікрокартон з пропиткою [72].

Детальна інформація з приводу технічних характеристик обладнання для знешкодження рідких відходів виробництва наведена в таблиці 9.1.

Таблиця 9.1

Технічні характеристики обладнання для знешкодження рідких відходів

Показник	Назва обладнання		
	Фільтр MPF0301AG1P25NBP01	Фільтр MPF1811AG2P10NB P01	Система зворотного осмосу MO11XLWE
Виробник	MP Filtri, Італія	MP Filtri, Італія	ECOSOFT, Україна
Максимальна продуктивність, л/добу	93600	403200	1200
Робочий тиск, бар	3,5 – 4,0	3,5 – 4,0	1,5 – 5,0
Діаметр підключення, дюйми	1/2	1/2	1
Електроживлення , вольт	-	-	400
Електроживлення , герц	-	-	50
Максимальний тиск у водопроводі, бар	8	8	-
Габарити, мм (Ш/В/(Д))	104/246	174/539	2200/900/900

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

У процесі біосинтезу наночастинок срібла з використанням дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* утворюються такі газоподібні відходи, як аераційне повітря після процесу культивування біологічного агента, котре має аерозоль клітин мікроорганізму, а також продукти його життєдіяльності. Зважаючи на те, що у процесі культивування витрачаються невеликі об'єми повітря, доцільним буде встановити безпосередньо на ферментер фільтр, подібний до того, що використовувався у якості індивідуального при подачі аераційного повітря до ферментера. Пропонується взяти фільтр SPF 005, котрий у якості фільтрувального матеріалу містить боросилікатне волокно та має продуктивність 75 м³/год та ступінь очищення 99,999% та здатен витримувати тиск до 16 бар [56].

Проте, зважаючи на малий діаметр пор даного фільтру, він буде швидко забиватись, відповідно доведеться часто його замінювати, що є неефективним. Тому, для зменшення навантаження на нього, пропонується перед ним встановити компактний кишеньковий фільтр класу F9, котрий здатен очищувати повітря на 95%. Такий прийом дозволить збільшити термін експлуатації індивідуального фільтра, а отже зменшити витрати на його заміну, не знижуючи якість знешкодження газоподібних відходів [55].

Специфікація обладнання для знешкодження газоподібних відходів наведена у таблиці 9.2.

Таблиця 9.2.

Технічні характеристики обладнання для знешкодження газоподібних відходів виробництва

Назва обладнання	Фільтрувальний матеріал	Ефективність очищення	Температурний діапазон	Каркасний матеріал	Робочий тиск
F-9 New Filter	мікроскловолокно	95%	-40°C...+170°C	Оцинкована сталь	16 бар
SPF 005	боросилікатне волокно	99,999%	-20°C...+150°C	Нержавіюча сталь	16 бар

9.3. Системи знешкодження та утилізації твердих відходів

У процесі біосинтезу наночастинок срібла з використанням з використанням дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* можуть утворюватися такі тверді відходи, як залишки біомаси та пакувальні матеріали тари мийно-дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища.

Зважаючи на те, що у виробничому процесі утворюються малі кількості біомаси, встановлення спеціальної системи для її знешкодження є не доцільним. Пропонується збирати такий тип відходів у колби для подальшої їх передачі на автоклавування.

Задля утилізації тари пластикової мийно-дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища пропонується його сортувати та в подальшому передавати на підприємство з переробки даного матеріалу. Упаковки та кришки сортують відповідно до видів пластику, наведених у таблиці 9.3.

Таблиця 9.3

Види пластику для сортування

Вид пластику	Маркування	Характеристика	Джерело
ПЕТ (PETE) – поліетилентерефталат		Використовується найчастіше, призначений для одноразового використання	[73]
ПВТ (HDPE) – поліетилен високого тиску		Не виділяє шкідливих речовин, має високий температурний діапазон використання	
ПВХ (PVC) – полівінілхлорид		Після тривалого періоду експлуатації починає виділяти токсичні речовини, утворюються високотоксичні сполуки при спалюванні	

ПНТ (LDPE) – поліетилен низького тиску		Нешкідливий	[73]
ПП (PP) – поліпропілен		Може виділяти формальдегід, термостійкий, чутливий до світла та кисню	
ПС (PS) – полістирол		Хімічно нестійкий	
ІНШЕ (OTHER) – полікарбонат та інші пластмаси		У контакті з гарячими рідинами здатен вивільняти бісфенол А	

Після сортування пластик необхідно ретельно помити та просушити перед передачею на підприємство з переробки. В Україні переробкою та утилізацією таких видів пластику займається «Регіон-2001» [74].

Також у процесі виробництва може утворюватися невеликий відсоток скляних відходів у результаті пошкодження скляного лабораторного посуду. Склобій пропонується збирати до окремої тари та далі відправляти на утилізацію до відповідного підприємства. Також може утворюватися певна кількість відходів з картону при використанні коробок з цього матеріалу у якості групової упаковки для мийно-дезінфікуючих засобів чи компонентів поживного середовища. Скляні та картонні відходи можна також відправляти на підприємство «Регіон-2001», що займається переробкою таких матеріалів [74].

РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЄКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

ДСТУ 2195-99 (Охорона природи. Поводження з відходами. Технічний паспорт відходу. Склад, вміст, виклад і правила внесення змін).

ДСТУ 3273-95. (Безпека промислових підприємств. Загальні положення та вимоги).

ДСТУ 3278-95 (Система розробки та постановки продукції на виробництво. Основні терміни та визначення).

ДСТУ 3803-98. (Біотехнологія).

ДСТУ 3812-98 (Охорона довкілля та раціональне поведіння з ресурсами. Контроль оперативний стічних вод очисних споруд міст і промислових підприємств. Загальні положення).

ДСТУ 3974-2000 (Система розробки та постановки продукції на виробництво. Правила виконання дослідно-конструкторських робіт. загальні положення).

ДСТУ 4462.3.01:2006. (Охорона природи. Поводження з відходами. Порядок здійснення операцій).

ДСТУ 8115:2015. (Біотехнологія. Методи попередження контамінації культур клітин).

ДСТУ 8428:2015 (Виробництво мікробіологічних засобів захисту рослин. Устаткування. Загальні технічні умови).

ДСТУ 8812:2018 (Якість повітря. Викиди стаціонарних джерел. Настанови з відбирання проб).

ДСТУ 9115:2021 (Система управління пожежною безпекою об'єкта захисту. Внутрішній аудит щодо оцінки протипожежного стану. загальні положення).

					НУХТ БТЕК 04.01.39 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 10 Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва			Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.									79	3
Керівник		Скроцька О.І.		Кафедра БТМ						
Н. Контр.										
Зав.каф.		Стабніков В.П.								

ДСТУ CR 12739:2019. (Біотехнологія. Лабораторії, що виконують дослідження, розроблення та аналізування. Звіт стосовно вибирання устаткування для біотехнологічних лабораторій залежно від ступеня небезпеки).

ДСТУ EN 775:2005 (Роботи промислові. Безпека).

ДСТУ EN 12128:2019. (Біотехнологія. Лабораторії, що проводять дослідження, розроблення та аналізування. Коефіцієнт заповнення мікробіологічних лабораторій, зони ризику, місце розташування та вимоги фізичної безпеки).

ДСТУ EN 12460:2019. (Біотехнологія. Великосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибирання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику).

ДСТУ EN 12469:2017. (Біотехнологія. Шафи мікробіологічної безпеки. Експлуатаційні характеристики).

ДСТУ EN 12683:2019. (Біотехнологія. Змінені організми для використання в довкіллі. Настанови щодо складання характеристики генетично зміненого організму через аналізування тривкості зміни геному на молекулярному рівні).

ДСТУ EN 12689:2019. (Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основ мікроорганізмів).

ДСТУ EN 12741:2019. (Біотехнологія. Лабораторії, що виконують дослідження, розроблення та аналізування. Настанови щодо діяльності біотехнологічних лабораторій).

ДСТУ ISO 5667-10:2005 (Якість води. Відбирання проб. Частина 10. Настанови щодо відбирання проб стічних вод).

ДСТУ ISO 9000-1-95. (Стандарти з управління якістю і забезпечення якості. Частина 1. Керівні вказівки по вибору і застосуванню).

ДСТУ ISO 9001-95. (Системи управління якістю. Вимоги).

ДСТУ ISO 9002-95. (Системи якості. Модель забезпечення якості в процесі виробництва, монтажу та обслуговування).

ДСТУ ISO 9003-95. (Системи якості. Модель забезпечення якості в процесі контролю готової продукції та її випробуваннях).

ДСТУ ISO 9004-1-95. (Управління якістю та елементи системи якості. Частина 1. Настанови).

ДСТУ ISO 10005:2019 (Керування якістю. Посібники з програм якості).

ДСТУ ISO 10018:2021 (Керування якістю. Посібник із залучення персоналу).

Закон України «Про лікарські засоби» № 123/96-ВР від 04.04.1996.

ICH Q1. (Випробування стабільності нових лікарських субстанцій та лікарських препаратів).

ICH Q2. (Валідація аналітичних методик).

ICH Q3. (Домішки в нових лікарських препаратах).

ICH Q5. (Тестування стабільності біотехнологічних/біологічних продуктів).

ICH Q6. (Процедури випробування та критерії прийнятності для нових лікарських субстанцій та лікарських препаратів).

ICH Q7. (Належна виробнича практика активних фармацевтичних інгредієнтів).

ICH Q8. (Фармацевтична розробка).

ICH Q9. (Управління ризиками для якості).

ICH Q10. (Фармацевтична система якості).

ICH Q11. (Розробка та виробництво лікарських речовин (хімічні сполуки та біотехнологічні/біологічні сполуки).

ICH Q12. (Технічні та регуляторні аспекти управління життєвим циклом лікарських засобів).

ICH Q13. (Безперервне виробництво лікарських субстанцій та лікарських препаратів).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tang S., Zheng J. Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, 7(13). doi: 10.1002/adhm.201701503.
2. Харченко Є.І., Лазюка Ю.В., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М. Отримання біогенних наночасток срібла з використанням дріжджів і перспективи їх застосування у протимікробній терапії. *Наукові праці НУХТ*. 2021, 27(3): 32-42. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-3-6.
3. Matei A., Matei S., Matei G.M., Cogălniceanu G., Cornea C.P. Biosynthesis of silver nanoparticles mediated by culture filtrate of lactic acid bacteria, characterization and antifungal activity. *The EuroBiotech Journal*. 2020, 4(2): 97-103. doi: 10.2478/ebtj-2020-0011.
4. Akl B.A. , Maha M.N., El-Saadony M. T. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Serratia marcescens* ssp *sakuensis* and its antibacterial application against some pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 2002, 11 (1): 1 – 8. doi: 10.21608/jacb.2020.76656.
5. Zivic F., Grujovic N., Mitrovic S., Ahad I.U., Brabazon D. Characteristics and application of silver nanoparticles. In: Commercialization of nanotechnologies – a case study approach (ed. Brabazon D., Zivic F., Sort J., Baró M.D., Grujovic N. et al.). Springer International Publishing. 2018, P. 227-273. doi: 10.1007/978-3-319-56979-6_10.
6. Baygar T., Ugur A. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces griseorubens* isolated from soil and their antioxidant activity. *IET Nanobiotechnol*. 2017, 11(3): 286-291.
7. Fernández J.G., Fernández-Baldo M.A., Berni E., Camí G., Durán N., Raba J., Sanz M.I. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*. 2016, 51(9): 1306-1313. doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2016.05.021>.
8. Salvadori M.R., Ando A.R., Nascimeto A.C.O., Corrêa B. Dead biomass of

Amazon yeast: A new insight into bioremediation and recovery of silver by intracellular synthesis of nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health*. 2017, A. doi: 10.1080 / 10934529.2017.1340754.

9. Микитюк М.В. Наночастинки та перспективи їх застосування в біології і медицині. *Проблеми екології та медицини*. 2011, 15 (5-6): 41-49.

10. Шлапак О.С. Нанотехнології у текстильній промисловості. *Вісник КНУТД*. 2011, 3: 107-112.

11. Khodashenas B., Ghorbani H.R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, 12: 1823-1838. doi: org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014.

12. Cunha F.A., Cunha M.C.S.O., Frota S.M., Mallmann E.J.J., Freire T.M., Costa L.S. et al. Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*: antifungal, catalytic and cytotoxicity activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018, 34: 127. doi: doi.org/10.1007/s11274-018-2514-8.

13. Beyene H.D., Werknehb A.A., Bezabha H.K., Ambayec T.G. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. *Sustainable Materials and Technologies*. 2017, 13: 18-23.

14. Скроцька О.І., Лазюка Ю.В., Харченко Є.В. Наночастки срібла та золота: практичне застосування, біосинтез з використанням дріжджів, біологічна активність. *Наукові праці НУХТ*. 2022, 28(1): 19-31.

15. Gurunathan S., Qasim M., Choi Y., Do J.T., Park C., Hong K. et al. Antiviral potential of nanoparticles—can nanoparticles fight against coronaviruses? *Nanomaterials*. 2020, 10. doi: 10.3390/nano10091645.

16. Гидрозоль срібра спреї / 29 мл Sovereign silver [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://organiclive.com.ua/product/1271?gclid=Cj0KCQiAhf2MBhDNARIsAKXU5GT3e_PsxHbMTk9PKsPrUzOszGs7v6Wyu_426ggN3cmpnHDreYz8-sAaAi5rEALw_wcB

17. Серебро American Biotech Labs, Silver Biotics, Silver gel, гидрогель с добавкой SliverSol с нано-серебром, 4 жидких унции (114 г) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://fair.ua/product/serebro-american-biotech-labs-silver-biotics-silver-gel-gidrogel-s-dobavkoj-sliversol-s-nano-serebrom-b6029ede.html>
18. Сільвер-Макс (118 мл) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ua.coral.club/shop/silver-max.html?offer=91619>
19. Nowack B., Krug H.F., Height M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science and Technology*. 2011, 45(4): 1177-1183. doi: doi.org/10.1021/es103316q.
20. Agressott E.V.H., Blatte D., Cunha F.A., Noronha V.T., Ciesielski R., Hartschuh A. et al. Vibrational spectroscopy and morphological studies on protein-capped biosynthesized silver nanoparticles. *ACS Omega*. 2020, 5: 386-393. doi: 10.1021/acsomega.9b02867.
21. Ellis D., Davis S., Alexiou H., Handke R., Bartley R. Descriptions of medical fungi second edition. Nexus Print Solutions. 2007. 198 p.
22. Jarros I.C., Veiga F.F., Corrêa J.L., Barros I.L.E., Gadelha M.C., Voidaleski M.F et al. Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. *EXCLI Journal*. 2020, 19: 687-704. doi: <http://dx.doi.org/10.17179/excli2019-1672>.
23. Sampaio J.P. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: The Yeasts, a Taxonomic Study (ed. Kurtzman P. et al.). Elsevier, 2011, p. 1873-1927. doi: doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00155-5.
24. Bushges R., Bahrenberg G., Zimmermann M., Wolf K. NADH : ubiquinone oxidoreductase in obligate aerobic yeasts. *Yeast*. 1994, 10: 475-479. doi: doi.org/10.1002/yea.320100406.
25. Carnecka M. Molecular study of intracellular changes as response of microorganisms to environment: Ph. d. thesis. Brno, 2009. 120 p.
26. Chatterjee S., Chatterjee N.C., Dutta S. Bio-reduction of chromium (VI)

to chromium (III) by a novel yeast strain *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC 9315). *African Journal of Biotechnology*. 2012, 11(83): p. 14920-14929. doi: 10.5897/AJB12.1899.

27. Duran N., Marcato P.D., De Conti R., Alves O.L., Costa F.T.M., Brocchi M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian chemical society*. 2010, 21(6): 949-959. doi: 10.1590/s0103-50532010000600002/

28. Колодяжний М.Г. Сучасний стан санітарно-епідемічної ситуації в Україні. *Питання боротьби зі злочинністю: наукові дослідження*. 2021, 42: 43-51. doi: 10.31359/2079-6242-2021-42-43.

29. Metabolic pathways - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/sce00010>

30. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. Київ, НУХТ. 2010. 632 с.

31. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. Київ, НУХТ. 2009. 336 с.

32. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування виробництв: Нав. Посібник. У 3 ч. – Ч. І. Ферментація. – Львів: Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2004. – 240 с.

33. Salvadori M.R., Ando R.A., Muraca D., Knobel M., Nascimento C.A.O., Correa B. Magnetic nanoparticles of Ni/NiO nanostructured in film form synthesized by dead organic matrix of yeast. *RSC Advances*. 2016, 6(65): 60683 – 60692. doi: 10.1039/c6ra07274g

34. San N.O., Donmez G. Biosorption of chromium(VI), nickel(II) and Remazol Blue by *Rhodotorula mucilaginosa* biomass. *Water Science & Technology*. 2012, 65(3): 471-477. doi: [10.2166/wst.2012.872](https://doi.org/10.2166/wst.2012.872)

35. Фамідез Ендо [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/instrumenty/famidez-endo>

36. Фамідез Форте [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/instrumenty/famidez-forte>

37. Стериокс [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/sterioks-baltiachemi-kiev>

38. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/e4cf84a5-25fa-46e8-aa14-dbfa240b974a/resource/d1a5b2a9-8a0e-48a1-be32-2173c6c40519>

39. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання/ Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук – К: НУХТ, 2019.-252 с.

40. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/e4cf84a5-25fa-46e8-aa14-dbfa240b974a/resource/698b11a0-4e82-4053-b498-b94cbe6e4e81>

41. Праймдез комбі [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/ru/instruktsiia/item/instruktsiya-po-primeneniyu-dezinfektsionnogo-sredstva-prajmdez-kombi/>

42. Oxivir Excel [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://eshop.diversey.swiss/de-ch/oxivir-excel-2x5l-fl%C3%BCssiger-desinfektionsreiniger-mit-breitem-wirkungsspektrum-auch-f%C3%BCr-100941436>

43. Dipankar C., Murugan S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, 98: 112-119. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.006.

44. Jadhav K.V., Dhamecha D.L., Dalvi B.R., Patil M.B. Green synthesis of

silver nanoparticles using *Salacia chinensis*: characterization and its antibacterial activity. *Particulate Science and Technology: An International Journal*. 2015, 33(5): 445-455. doi: 10.1080/02726351.2014.1003628.

45. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: - К.: НУХТ, 2022. – 373 с.

46. Floor refrigerated high speed centrifuge [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.mrclab.com/floor-rfe refrigerated-high-speed-centrifuges>

47. Stainless steel high pressure laboratory chemical reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/10L-20L-30L-50L-100L-200L_1600259441420.html?spm=a2700.7724857.0.0.201f415fmOhkCw&s=p

48. 3015 шафа сушильна Labexpert [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://shop.hlr.ua/ua/3015-shkaf-sushilnyy-labexpert-219204.html>

49. Повітрозабірник [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://eurobudkamin.com.ua/ua/p1568149990-vozduhozabornik-kratki-kruglyj.html>

50. КБ «Технофільтр»: фільтри і фільтроматеріали для систем очистки воздуха и окрасочных камер [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/wp-content/uploads/2020/05/Catalog.pdf>

51. Компактные безмаслянные поршневые компрессоры LFX [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.atlascopco.com/ru-ua/compressors/products/air-compressor/oil-free-air-compressors/lfx-compact-oil-free-piston-compressors>

52. COMPAIR F — ефективний холодильний осушувач [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/ua/p108061690-osushiteli-refrizheratornye-compair.html>

53. Ресивер на 200 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://k-m-s.all.biz/uk/povitrozbirnyk-resyver-200-l-g7301640>

54. Канальні нагрівачі Systemair: електричні і водяні. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.systemair-ukraine.com/ua/air-heaters.html>

55. Компактные карманные фильтры от NEW FILTER. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionne_filtri/kompaktnye-karmannye-filtry-fvkom-_w-tipa_.html

56. SPF серия, стерильные фильтры в нерж. корпусе, 16 бар [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.remeza.com/catalog/system_compressed/air_filters/spf_series/

57. Дозатор ваговий FOYER FL-500 вібротолчковий роторної дії [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fl-500>

58. Дозирующий насос Kronos IR. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/ru/catalog/kronos-inductivity-mode-2/>

59. Бактериальный биореактор 30 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.knikbio.com/ru/bacteria-bioreactor-l-54.html>

60. Універсальна проточна центрифуга Unifuge Pilot [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://labdepo.com.ua/universalna-protochna-centrifuga-unifuge-pilot_ua

61. 7 gallon ace roto-mold inductor full drain cone bottom tank [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ntotank.com/7gallon-acerotomold-white-inductor-cone-bottom-tank-x1138427>

62. Мобильный реактор РСГ-30 для мягких лекарственных форм [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://promvit.com.ua/mobilnyj-mazevoj-reaktor-30-l-rsg-30/>

63. Красінко В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. К.: НУХТ, 2019. 252 с.

64. Gualberto N.C., Nogueira J.P., da Silva A.S., Barbosa P.F., Matos C.M.S., Rajan M., Neta M.T.S.L., Nrain N. Optimization of the biotechnological process using *Rhodotorula mucilaginosa* and acerola (*Malpighia emarginata* L.) seeds for the production of bioactive compounds. *LWT*. 2022, 15. doi: doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113190

65. Калініченко С.В., Рижкова Т.А., Антушева Т.І., Скляр Н.І., Коротких О.О. Метод визначення катаболічної активності мікроорганізмів за кількістю окисленої глюкози. *Вісник проблем біології і медицини*. 2012, 97: 150-153.

66. Юкало В.Г. Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни «Біохімія» для студентів спеціальності 163 «Біомедична інженерія» усіх форм навчання. – Т.: ТНТУ, 2019. – 78 с.

67. Решетник К. Особливості синтезу білка у міцелії *Pleurotus ostreatus* за дії лазерного опромінення. *Науковий вісник національного університету імені Лесі Українки*. 2020, 2: 25-30. doi: <https://doi.org/10.29038/2617-4723-2020-390-2-25-30>

68. Zhang W., Yao Y., Sullivan N., Chen Y. Modeling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics. *Environmental Science & Technologies*. 2011, 45: 4422-4428. doi: [dx.doi.org/10.1021/es104205a](https://doi.org/10.1021/es104205a).

69. Система зворотного осмосу Ecosoft MO-1 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.aqua-room.com.ua/sistema-obratnogo-osmosa-ecosoft-mo-1>

70. Красінько В.О. Природоохоронні біотехнології [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв. – проф. прогр. «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. - К: НУХТ, 2020. – 218 с.

71. ECOSOFT MO-1 (MO11XLWE) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://waters.com.ua/filtry-dlya-pityevoy-vody/promyshlennyye-sistemy-obratnogo-osmosa/ecosoft-mo-1/>

72. Фільтр зливний (зворотної лінії) MP Filtri MPF 1811 [Електронний

ресурс]. Режим доступу: <https://hydraulic.ua/filtr-zlivniy-zvorotnoi-linii-mp-filtri-mpfl811-mikrokarton-z-propitkou-10-mkm-280-l-khv/>

73. Позначки на пластику: що потрібно знати, коли ви купуєте воду в пластиковій пляшці [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://solvetpv.lviv.ua/poznachky-na-plastyku-shho-potribno-znaty-koly-vy-kupuyete-vodu-v-plastykovij-plyashti/>

74. Заготівельно-виробниче приватне підприємство «Регіон-2001» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://region-2001.com.ua/services/pererobka-vtorsirovini/pererobka-smittya-ta-vidkhodiv/pererobka-plastika>

Особливості одержання наночасток срібла у *Rhodotorula glutinis* BNM 0524

Microorganisms (WDCM938) of the "Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA)", Argentina. The yeasts were grown on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 48 to 72 h and were maintained on PDA slants. These yeasts were chosen for the nitrate reductase activities that they displayed. The antifungal activity was assessed against the phytopathogenic fungi: *Botrytis cinerea* (BNM 0528), *Penicillium expansum* (CEREMIC 151-2002), *Aspergillus niger* (NRRL 1419), *Alternaria sp.* (NRRL 6410), and *Rhizopus sp.* (NRRL 695). The isolates were maintained on PDA at 4°C for further studies.

2.2. Culture

C. laurentii and *R. glutinis* were cultured in Muller-Hinton broth (MHB), the composition of which was (g L⁻¹): beef infusion, 2; acid casein peptone, 17.5; corn starch, 1.5; pH 7.4. The medium was inoculated with a suspension of 2.0×10⁶ yeast cells mL⁻¹. Next, the culture flasks were incubated at 28°C and 100 rpm in an orbital shaker. After 24 h of incubation, the cultures were centrifuged at 11,000 × g for 10 min

6

f
L
n

ACCEPTED MANUSCRIPT

The Ag NP formation was verified by surface plasmon resonance (Figure 1). In both cases, a wide spectrum, characteristic of a high distribution of size nanoparticles, was observed. These samples were analyzed for size distribution and zeta potential by photon correlation spectroscopy. The Ag NPs produced by *C. laurentii* showed two populations of different sizes (Figure 2a), one centered at 400 nm (13%) and another around of 35 nm (74%). The presence of these two populations of particles was confirmed by the transmission electron microscopy images (Figure 2b). The quantification of the size distribution of the Ag NPs from *R. glutinis* was as follow: 65% at 15 nm, 17% at 160 nm and 18% at 220 nm (Figure 3a). The TEM images are shown in Figure 3b.

A spectroscopic analysis by fluorescence emission was also performed. Figure 4 shows the fluorescence emission spectra of the Ag NPs from *R. glutinis* and *C. laurentii*. An emission band centered at 345-355 nm (λ_{exc} 295 nm) was observed. The nature of the emission indicated presence of proteins in the supernatant containing the

f
L
n

126 according to the procedure followed by Harley [18] and Saifuddin et al. [19]. A 5 mL
127 aliquot of culture supernatant of the yeast was mixed with 5 mL of assay medium (30
128 mM KNO₃ and 5% propanol in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.5) and incubated in the
129 dark for 1 h. After incubation, the nitrites formed in the assay mixture were estimated
130 by adding 2.5 mL of sulphanilamide and N-(1-naphthyl) ethylene diamine
131 dihydrochloride solutions to it. The color developed was measured in an UV-Vis
132 spectrophotometer at 540 nm. The enzyme activity was finally expressed in terms of
133 nmol of nitrite h⁻¹ mL⁻¹.

134

135 2.4. Synthesis of silver nanoparticles

136 For the synthesis of the Ag NPs, one milliliter of an aqueous silver nitrate
137 solution (1 mM) was added to Erlenmeyer flasks containing 100 mL of yeast culture
138 supernatant free of cells. The resulting mixture was shaken at 100 rpm in an orbital
139 shaker for 48 h at 28 ± 4°C in dark. Appropriate controls (uninoculated MH medium
140 plus silver nitrate and yeast culture supernatant without silver nitrate) were run
141 simultaneously. The experiment was carried out in triplicate.

7

ACCEPTED MANUSCRIPT

Особливості одержання наночастинок срібла у *Streptomyces griseorubens* AU2

expose toxic chemical wastes [1].

Biological methods for green nanosynthetic routes are known to be environmentally safe, inexpensive and time saving applications thus they provide appreciable results for nanotechnology. Novel green synthesis strategies using various biological organisms have been recognised as a promising source for reducing metals by specific metabolic pathways [2].

Microorganisms of different taxonomic categories from fungi and prokaryotes such as *Fusarium oxysporum* [3], *Aspergillus flavus* [4], *Bacillus licheniformis* [5] and *Klebsiella pneumoniae* [6] have been used for AgNP biosynthesis through their cell mass or extracellular components.

Members of Actinobacteria isolated from various ecological environments were recently investigated as potential synthesizers of metallic nanoparticles [7]. Among the class Actinobacteria, the biosynthesis of AgNPs intra/extracellularly has been reported for *Thermomonospora* sp. [8], *Rhodococcus* sp. [9] and *Streptomyces* sp. [1, 10–17].

Streptomyces is a genus of Gram-positive aerobic bacteria that grows in various environments, with a filamentous form similar to fungi [18]. The *Streptomyces* species, members of the bacterial order Actinomycetales, are found worldwide in soil. Organisms from the genus *Streptomyces* produce effective bioactive compounds and are intensively used in the agricultural, pharmaceutical and enzyme industries. Therefore, they are well known for industrial manufacturing purposes [10, 19]. Though there is only one study about the AgNP biosynthesis from *Streptomyces griseorubens* isolated from marine sediment [17], the present investigation is the first report of the extracellular AgNP biosynthesis by using *S. griseorubens* isolated from soil.

performed via TEM and SEM equipped with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The *in vitro* antioxidative potential of the biosynthesised AgNPs was performed by free radical scavenging activity.

2 Materials and methods

2.1 Isolation and molecular identification of *Streptomyces griseorubens* AU2

The actinomycete strain was isolated from soil at an orange farm located in Koycegiz district of Mugla Province in the Aegean region of Turkey. Soil sample was taken according to the method of Brown [20]. International Streptomyces Project 2 (ISP-2) medium (10 g l⁻¹ malt extract, 4 g l⁻¹ yeast extract, 4 g l⁻¹ glucose and 20 g l⁻¹ agar, pH 7.3) with 2 g/l calcium carbonate addition was used to isolate the strain. The isolated *S. griseorubens* AU2 strain were maintained in 30% glycerol (v/v) at -20°C in the Mugla Sıtkı Kocman University Collection of Microorganisms (MU). For biosynthesis, pure *S. griseorubens* AU2 culture were maintained at 4°C in ISP-2 agar plates and sub-cultured continuously at regular intervals.

The strain *S. griseorubens* AU2 was identified with the sequence of 16S rDNA which was amplified by three primer couples as 925F ---->5'-AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG-3', 1491R ----> 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3', 529F---->5'-GTG CCA GCM GCC GCG G-3', 1099R---->5'-GGG TTG CGC TCG TTG-3', 27F---->5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 780R---->5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC TGT T-3'. The polymerase chain reaction (PCR) condition was adjusted

IET Nanobiotechnol., 2017, Vol. 11 Iss. 3, pp. 286-291
© The Institution of Engineering and Technology 2016

286

А
Ч
П

rDNA sequence.

2.1 Biosynthesis of AgNPs

The method described by Zonooz and Salouti [10] was slightly modified for microbial mediated synthesis of AgNPs. The pure *S. griseorubens* AU2 culture was inoculated on ISP-2 broth under aseptic conditions and the flasks were incubated at 28°C and 130 rpm for 7 days. After the incubation period of 7 days completed, the culture was centrifuged at 4000 rpm for 20 min and the biomass was used as the main stock for the biosynthesis of AgNPs. For that purpose, the biomass was washed with dH₂O for three times. Then, the biomass was suspended in dH₂O and incubated at 28°C and 130 rpm for 48 h. At the end of the incubation period, the cell-free culture supernatant that would be used for biosynthesis was obtained by centrifugation at 4000 rpm. About 10 ml of cell-free supernatant and 50 ml Ag nitrate (AgNO₃) solution (1 mM) (filtered through a 0.22 µm filter) were incubated at 28°C and 130 rpm for 48 h. After the incubation period, the solution was observed for visual colour change. The flasks turned from opaque white to brownish yellow indicated the presence of AgNPs.

2.2 UV-vis spectral analysis

Microbiologically synthesised AgNPs by *S. griseorubens* AU2 cell-free culture supernatant was monitored by Multiskan GO UV-vis Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) within a range of 300–700 nm operated at a resolution of 1 nm. About 1 mM AgNO₃ solution was used as control.

2.3 FT-IR spectral analysis

Bio-reduction of the Ag ion (Ag⁺) ions using the cell-free culture supernatant of *S. griseorubens* AU2 was monitored by FT-IR (Thermo Scientific Nicolet iS10-ATR, USA) at a resolution of 4 cm⁻¹ in potassium bromide (KBr) pellets and the spectra were

[21]. The percentage of inhibition was calculated by the following equation: % DPPH scavenging effect = [(control_{OD} - sample_{OD}) / control_{OD}] × 100, where control was prepared without AgNPs. A strong antioxidant, ascorbic acid, was used as positive control.

3 Results and discussion

According to the morphological characterisation of the strain, it was an aerobic Gram-positive actinomycete which grew well on ISP-2 medium that the colour of aerial mycelium was white and the reverse side of the colony was grey (Fig. 1). Sequencing analysis of the strain *S. griseorubens* AU2 was performed on an ~1484 bp PCR product and identified as *S. griseorubens* on the basis of 16S rDNA sequencing, which revealed 99% homology (GenBank Accession Number: KX156364).

In the present paper, microbial mediated biosynthesis of AgNPs were achieved extracellularly using the cell-free supernatant of *S. griseorubens* AU2. Similar to the previous reports [1, 15, 22, 23], the formation of brown colour in the AgNO₃ treated flasks indicated the Ag nanoparticle formation. There was no colour change in the control flasks (cell-free supernatant without AgNO₃ and the AgNO₃ solution). The visual colour change may be due to the Ag⁺ reduction by secondary metabolites present in the cell-free supernatant of the *S. griseorubens* AU2. Using the supernatant formed from the autolysed *S. griseorubens* AU2 biomass caused the formation of nanoparticles to occur in a clear solution, so there were not any mycelial materials, bacteria cell or medium in the reaction mixture [19].

Fig. 2 shows the UV-vis spectrum of the AgNPs following incubation for 24 h. UV-vis spectral analysis indicated that the AgNP solution has a strong and broad absorption peak at 422 nm, which is related to the surface plasmon resonance (SPR) band of AgNPs, as metal AgNPs have free electrons, which give rise to an SPR absorption band [24, 25]. The absorption peak at 422 nm is probably due to the excitation of longitudinal plasmon vibrations and formation of quasi-linear superstructures of nanoparticles [26].

А
Ч
П

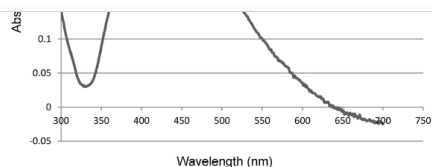


Fig. 2 UV-vis spectrum of AgNPs synthesised by cell-free supernatant of *S. griseorubens* AU2

C–N stretching (1383 cm^{-1}) and O–H stretch (1020 cm^{-1}). This FT-IR result of synthesised AgNPs were quite similar to previous reports by Mohanta and Behera [22] and Karthik *et al.* [27]. When the metal nanoparticles are formed in the solution, they must be stabilised against the Van der Waals forces of attraction which may otherwise cause coagulation. FT-IR analysis data confirms the presence of O–H stretching (around 3408 cm^{-1}) which may have a key role of reducing metal ions to their respective nanoparticles [22, 28]. Our results are also in agreement with the results of Shanmugasundaram *et al.* [15] and Gopinath *et al.* [28] who suggested that proteins can bind to nanoparticles and stabilise AgNPs.

XRD pattern of the cell-free supernatant of *S. griseorubens* AU2 treated with AgNO_3 (Fig. 4) corresponded four intense peaks located over the range of 2θ values (i.e. $30\text{--}80^\circ$). A comparison of our XRD spectrum with the reported reference values of International Centre for Diffraction Data card number 01-714-613 provided by the instrument's library matched well and AgNPs were present as nanocrystals. The peaks at the 2θ values of 37.88° , 43.94° , 64.31° and 77.19° corresponded to the $1\ 1\ 1$, $2\ 0\ 0$, $2\ 2\ 0$ and $3\ 1\ 1$ cubic crystal lattice planes of Ag, respectively [10, 15, 28].

TEM and SEM are powerful methods to determine the size and morphology of nanostructures. Representative TEM images

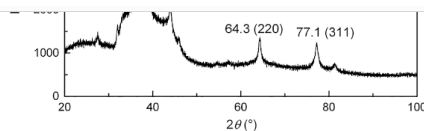


Fig. 4 XRD pattern of AgNPs synthesised by cell-free supernatant of *S. griseorubens* AU2

supernatant of *S. griseorubens* AU2. The images recorded at higher magnification displayed the detailed morphology and size of the biosynthesised AgNPs. The AgNPs were found to be spherical and exhibit particle sizes ranging from 5 to 20 nm.

Elemental analysis of the biosynthesised AgNPs was investigated by EDS (Fig. 6) combined with HR-TEM. The EDS linescan spectrum recorded a strong signal for Ag. The peaks corresponding to C, O, Si and Cu were most likely caused by X-ray emission from the carbon-coated copper grid.

Fig. 7 shows representative SEM of the AgNPs synthesised by *S. griseorubens* AU2. As it was confirmed using the TEM images, SEM also showed the presence of homogenous spherical AgNPs that are relatively uniform.

The EDS analysis applied over the SEM showed a strong Ag signal which confirms the presence and crystalline structure of metallic Ag (Fig. 8). Other signals of C, O and N atoms are maybe due to X-ray emission from the remaining media [29].

TEM and SEM images of biosynthesised AgNPs are similar to the reports of Sadhasivam *et al.* [1] and Shanmugasundaram *et al.* [15] who biosynthesised AgNPs via *Streptomyces hygroscopicus* and *Streptomyces naganishii* MA7, respectively.

DPPH is a stable free radical which has a characteristic absorbance at 517 nm, but reduction by an antioxidant or a radical species decreases its absorption. Lower absorbance of the reaction mixture indicates higher DPPH free radical scavenging activity [30]. In this paper, various concentrations of 20, 40, 60, 80 and

AK
Что
*Па

Особливості одержання наночасток срібла у *Rhodotorula mucilaginosa*

fungi when compared to bacteria are that they possess few nutritional demands, produce a large amount of biomass and can be easily handled. Furthermore, most species used in the AgNPs production are not pathogenic for humans and animals, which simplifies and make the process cheaper (Devi et al. 2014; Ahluwalia et al. 2014).

Rhodotorula glutinis (Rg) and *Rhodotorula mucilaginosa* (Rm) are pigmented yeasts, important in the food industry, found in many parts of the world and can be isolated from different substrates, like soil, water, wood and decomposing fruits (Aksu and Eren 2005, 2007). They produce important pigments such as β -carotene, γ -carotene, torulene and lycopene (Hernández-Almanza et al. 2014). They also present big potential in the biodiesel industry, because they are able to convert the main sub product of the biodiesel industry, glycerol, into carotenoids (Cutzu et al. 2013).

Among AgNPs functionalities, the catalytic activity must be highlighted, mainly because effective and ecologically friendly catalysts for the degradation of pollutants are a necessity for present times. Examples are the catalytic reduction of 4-nitrophenol (4-NP) (Ansari et al. 2013) and methylene blue (MB) (Aziz et al. 2015). 4-NP is a compound present in effluents from chemical industries that produce insecticide, medicines and inks. This compound presents high toxicity for animals by harming mitochondria. As it is soluble in water, 4-NP contaminates water and soil collections (Edison and Sethuraman 2013). MB is an organic sulfonated dye that may present acute toxicity (Uddin et al. 2009). MB can be reduced by strong reducer agents like NaBH_4 in order to form organic molecules. However, the reaction is too slow (Suvith and Philip 2014), and this factor alone reveals the need of a

peptone (Himedia-India), glucose (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%), agar potato-glucose (Himedia-India), NaCl (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%), Mueller-Hinton medium agar (Himedia-India), 4-nitrophenol (4-NP) (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%), methylene blue (MB) (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%) and fluconazole (Sigma—United States) were purchased and used without purification and its fundamental properties were assured by the manufacturers.

Isolating and identifying yeasts

Rhodotorula glutinis and *Rhodotorula mucilaginosa* were isolated from the soil around the Pici Campus, Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-Ceará-Brazil); Latitude: $3^{\circ}44'20.832''\text{S}$, Longitude: $38^{\circ}34'12.483''\text{W}$; and $3^{\circ}44'21.750''\text{S}$, $38^{\circ}34'12.350''\text{W}$, respectively. 50.0 g of soil were collected and transported, in plastic bags placed in thermal boxes, to the Microbiology Laboratory of Yeasts of the Department of Clinical and Toxicological Analysis from the Universidade Federal do Ceará. Samples were diluted in NaCl 0.9% and added to an aqueous medium containing MGYP [malt extract (0.3%), glucose (1%), yeast extract (0.3%), peptone (0.5%); antibiotics, pH 7] and incubated $25^{\circ}\text{C}/72\text{ h}$. After growth, the samples were inoculated on potato glucose agar and maintained at $25^{\circ}\text{C}/72\text{ h}$. Yeasts suggested to belong to the *Rhodotorula* genus were seeded again on potato-glucose agar to obtain an isolated and pure strain. The identification of genus and species was carried out in the automated system VITEC®2 from BioMérieux® S.A., YST card.

Springer

Ак
что
"Па

Biosynthesis of AgNPs

Two yeasts were selected, *R. glutinis* (Rg) e *R. mucilaginosa* (Rm), after isolation and identification. The yeasts grow in Erlenmeyer flasks of 500.0 mL containing 200.0 mL of MGYP at $25^{\circ}\text{C}/72\text{ h}$. After growth, the fungal biomass was centrifuged at 4,000 rpm for 10 min and washed three times in order to remove wastes from the culture medium. Immediately after washing, the yeasts were weighted (5.0 g, humid weight) and put in an Erlenmeyer flask with 100.0 mL of autoclaved deionized water for 48 h at 25°C without agitation. After this time, the suspensions containing yeasts were filtered with a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ membrane. To 90.0 mL the filtrate was added 10.0 mL of 10 mM AgNO_3 final concentration 1 mM AgNO_3 and they were incubated at $25^{\circ}\text{C}/168\text{ h}$. Aliquots were removed in 24-h intervals and tests were conducted to assess AgNPs formation. The positive control contained only the yeast extract without AgNO_3 and the negative control contained only the solution of 1 mM AgNO_3 . Samples were named Rg and Rm AgNPs.

Purification of AgNPs

After 168 h of reactions, the AgNPs were purified by centrifuging the suspension at 10,000 rpm for 20 min in a HIMAC CS150NX ultracentrifuge. The solid waste was washed three times with deionized water then dried in a desiccator. The residue was used for the following characterization phases.

Characterization of AgNPs

The light absorption spectrum of Rg and Rm AgNPs were performed using a UV-Vis spectrophotometer (Thermo

Rg and Rm AgNPs were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The samples were prepared by pouring a drop of a diluted suspension of silver nanoparticles on carbon-coated copper grids and by allowing water to evaporate. The shape and size of nanoparticles were determined from TEM micrographs. The software (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA) for the digital TEM camera was calibrated for size measurements of the nanoparticles. TEM measurements were performed on a JEOL model 1200EX. The atomic force microscopy (AFM) analyses were performed using a Multimode Nanoscope IIIa (Bruker, CA, USA), in tapping mode (or intermittent mode). In this scanning mode, the AFM tip approaches the sample surface (but does not touch it) with beats of similar amplitude to the resonance amplitude of the AFM cantilever. In this way, we avoid the action of lateral forces between the tip and delicate samples, preventing it to be dragged on the substrate surface or damaged in sample surface. We use a rectangular probe model TESPA7 (Veeco) with nominal spring constant of $k=20\text{--}80\text{ N/m}$ and resonance frequency of 291–326 kHz. The scan parameters for the image acquisition were 0.5 Hz of scan rate and 512×512 lines of resolution.

Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) was carried out to determine the resulting Ag concentration in each AgNPs solutions. In the preparation for ICP-OES, the samples were first digested in a solution of HNO_3 and HCl. A 20.0 μL of each sample was diluted to 1.0 mL with water and then heated to 80°C in a covered test tube. To this, 1 mL of HNO_3 was added, and the mixture was allowed to sit for 1 h at 80°C . HCl (2 mL) was then added to form aqua regia, and the mixture was allowed to sit for an additional hour. Following cooling, the solutions were dispersed into 10 mL of water in a volumetric flask.

Ак
что
"Па

(51.0 ± 10.7 nm) and 61.8 ± 1.1 nm (60.7 ± 27.5 nm), as shown in Figures S7(c) and S8(c), respectively.

duced by the yeasts described in this study are shown. The results showed AgNPs with rounded morphology

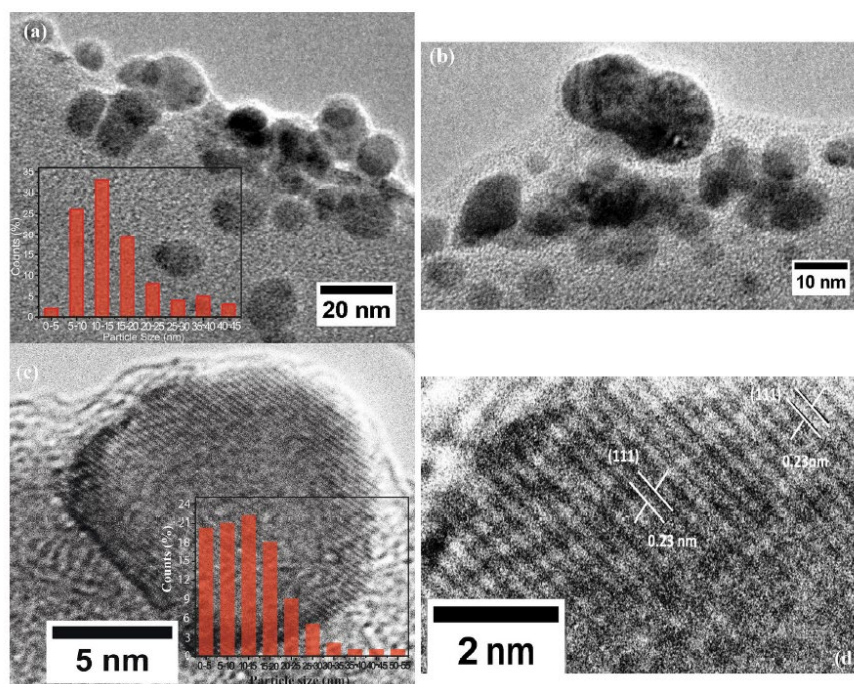


Fig. 2 a–b TEM of AgNPs produced by *R. glutinis*. c–d TEM of AgNPs produced by *R. mucilaginosa*

Особливості одержання наночасток срібла у *Rhodotorula mucilaginosa*

2 M. R. SALVADORI ET AL.

to the company Vale S.A. located in Canaã dos Carajás, Pará, Brazilian Amazonia region (06°26'S latitude and 50°4'W longitude).^[23] *R. mucilaginosa* was maintained and activated on YEPD agar medium (10 g of yeast extract per L, 20 g of peptone per L, 20 g of glucose per L and 20 g of agar per L). The medium components were obtained from Oxoid (England).^[25]

Biosorption of Ag⁺ by dead biomass of the yeast for the synthesis of Ag/Ag₂O NPs

All chemicals used in the present research were of analytical grade and were used without further purification. All dilutions were prepared in double-deionized water (Milli-Q Millipore 18.2 MΩ cm⁻¹ resistivity) (Millipore, Milford, MA). The silver stock solution was prepared by dissolving Ag NO₃ (Carlo Erba, Milan, Italy) in double-deionized water. The working solutions were prepared by diluting this stock solution. The dead yeast biomass used to examine its ability to bind Ag⁺ was obtained according to Salvadori et al.^[23] The yeast biomass was grown in YEPD broth for 20 h at 27°C on a rotary shaker at 150 rpm, harvested by centrifugation, and washed with double-deionized water. An appropriate amount of biomass was autoclaved and is referred to as dead biomass.

The effects of physicochemical parameters on the adsorption efficiency of Ag⁺ onto the biosorbent and on the removal of silver were evaluated under the following conditions: pH

using Eq. (3):

$$C_e/q_e = 1/(q_m \cdot b) + C_e/q_m \quad (3)$$

where C_e is the equilibrium metal concentration (mg L⁻¹), q_e is the biosorption capacity of the biosorbent at equilibrium (mg g⁻¹), q_m is the monolayer sorption capacity of the sorbent (mg g⁻¹), and b is the Langmuir sorption constant (L mg⁻¹). The essential features of the Langmuir isotherm can be expressed in terms of equilibrium parameter R_L , which is a dimensionless constant referred to as separation factor or equilibrium parameter,^[27] calculated using Eq. (4):

$$R_L = 1/1 + bC_0 \quad (4)$$

where the R_L value provides information as to whether the adsorption is irreversible ($R_L = 0$), favorable ($0 < R_L < 1$), linear ($R_L = 1$) or unfavorable ($R_L > 1$), b is the Langmuir sorption constant (L mg⁻¹) and C_0 is the initial concentration of the metal (mg L⁻¹).

Characterization and analysis of Ag/Ag₂O NPs

Ag/Ag₂O NPs were synthesized by reducing silver nitrate in aqueous solution in the presence of dead biomass of *R. mucilaginosa* at a concentration of 100 mg L⁻¹ silver using the equilibrium model data. The synthesized NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM)

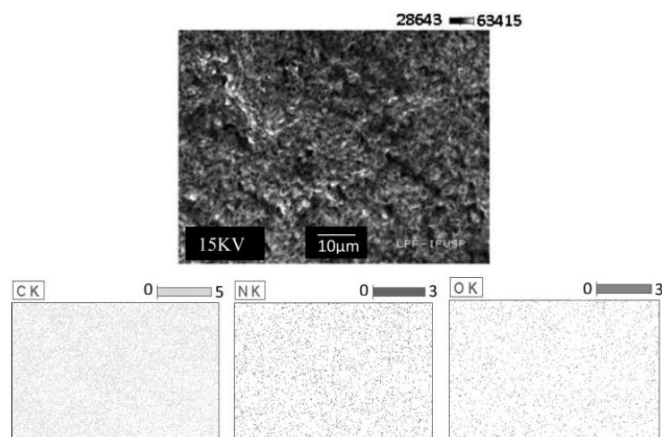
4 M. R. SALVADORI ET AL.

fact that it does not require growth media or nutrients in the feed solution and that the regenerated biomass can be reused.^[28–34]

Characterization of the parameters of silver adsorption by dead yeast biomass and biosorption isotherm model

This study determined the best physicochemical conditions for silver biosorption using dead biomass of *R. mucilaginosa*, with

initial pH 4.0, biosorbent dose of 0.5 g, agitation speed of 150 rpm, contact time of 60 min, temperature of 30°C, and initial silver concentration of 100 mg L⁻¹. The efficiency of silver uptake by the dead biomass of *R. mucilaginosa* was 99.82%. The dead yeast biomass was able to produce Ag/Ag₂O NPs from silver in aqueous solution, with a maximum uptake capacity of the metal equal to 49 mg g⁻¹. The Langmuir model was used to describe the silver biosorption isotherm for dead biomass of the yeast (Fig. 1). Table 1 shows the maximum loading

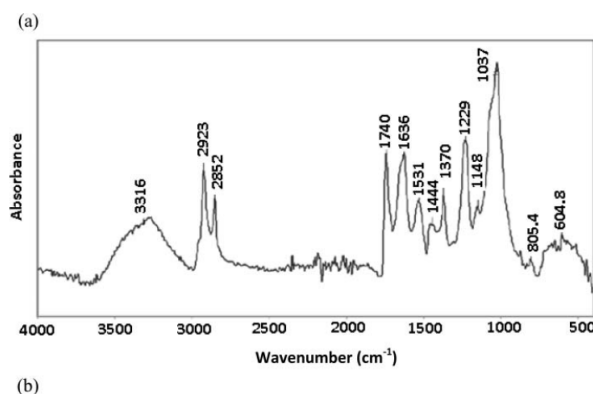


Biosynthesis of Ag/Ag₂O NPs

Exposure of aqueous silver ions to dead biomass of *R. mucilaginosa* resulted in the production of Ag/Ag₂O NPs by a sustainable chemistry process. Various studies have characterized the shape and size of silver nanoparticles by TEM.^[41–44] The representative TEM images of thin sections of dead biomass recorded the shape, size and location of Ag/Ag₂O NPs which arose from the bioreduction of silver ions by the dead *R. mucilaginosa* biomass (Fig. 2). Figure 2a shows the control sample, i.e., untreated dead biomass with silver ions. The presence of intracellular silver NPs, was observed after treatment with a silver ion solution (Fig. 2b). The NPs had a predominantly spherical shape and an average diameter of 11.0 nm.

NPs respectively; Figure 3a and b and the SEM micrographs show amplified images of a dead yeast cell without and with Ag/Ag₂O NPs (Fig. 3c and d, respectively).

The elemental composition of micro-areas of the dead yeast biomass after biosynthesis of silver NPs was determined using SEM-EDS maps (Fig. 4). Spot profile analysis identified silver as the main component, confirming the adsorption of this element by the dead biomass. Trace amounts of elements such as C, N, O and P were found to be uniformly distributed over the dead yeast biomass and are probably derived from proteins and other biopolymers in the biomass that could act as capping material on the surface of the silver NPs.^[45] Similar observations were made for the synthesis of copper and nickel NPs using dead biomass of yeast *R. mucilaginosa*.^[23,24]



Особливості одержання наночастинок срібла у *Rhodotorula mucilaginosa*

water, and decaying soils, which makes it relatively easy to obtain them for cultivation in laboratories and for storage. The feeding of fungi with sucrose or glucose creates enzymes in broth that are easily storable and reusable according to the needs. After separating the fungus from the enzyme broth, silver nitrate is added to the broth and the stabilization of the nanoparticle is achieved by the formation of a thin layer of protein cover that involves the Ag nucleus in a mechanism that has been investigated for different fungi.^{14,15} These microorganisms possess the capacity to carry out the reduction of metal ions to metallic nanoparticles due to the secretion of a large number of enzymes (generally proteins); the said protein layer generates compartments capable of providing structural, spatial, and chemical controls for the stabilization and generation of nanoparticles.^{12,15} The AgNPs created by the fungi Rm and Rg are very stable (we have AgNPs in perfect conditions that have been stored for many months). When compared with other nontoxic alternative methods (e.g., plants and bacteria), Rm and Rg fungi-based methods generate a much larger amount of biomass.^{7–14} Plants might be used, but this method requires a place (e.g., orchards) and a continuous maintenance; it occupies a larger space, and thus, it is more time-consuming; bacteria culture might not be healthy because many of them can be very dangerous for human beings. It should be noted that it is not a straightforward answer to say which method of green synthesis is the best; there are many variables involved that will depend more on the protocols, materials, resources, and biological organisms that we have at hand. Finally, the use of Rm and Rg fungi is very convenient

microscopic—spectroscopic—optical investigation of these nanoparticles. Atomic force and scanning electron microscopy techniques were employed to obtain physical information about the core and the protein layer. Statistical and comparative studies were made using the data provided by these techniques. Chemical and optical analyses of the AgNPs were carried out through surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), photoluminescence (PL) spectroscopy, and dark-field scattering. Together, they give us a greater approach on the study of the properties and characteristics of AgNPs synthesized by Rm and Rg fungi.

2. EXPERIMENTAL DETAILS

Synthesis processes mediated by fungi *R. glutinis* and *R. mucilaginosa* were made according to the procedure and reported by Cunha et al.¹⁴ and Noronha et al.¹⁵ The synthesis process in the laboratory is relatively fast; at the beginning, it takes a few days to prepare the culture and to biosynthesize the NPs, but after that the AgNPs are stored in a well-sealed container in deionized water in a dark, dry place at room temperature. AgNPs can be stored for months (we have AgNPs stored for 12 months in perfect condition) and, therefore, can be used repeatedly for applications and/or characterizations. To use them, one just has to take the desired amount of the stored AgNPs, sonicate, and dilute; this takes only a few hours and large quantities can be prepared if necessary. Further details on the biogenic synthesis are given elsewhere.^{10–14} A summary of the whole process is illustrated in Figure 1.

387

DOI: 10.1021/acs.omega.9b02867
ACS Omega 2020, 5, 386–393Ак
Чтс
"Па

fungi when compared to bacteria are that they possess few nutritional demands, produce a large amount of biomass and can be easily handled. Furthermore, most species used in the AgNPs production are not pathogenic for humans and animals, which simplifies and make the process cheaper (Devi et al. 2014; Ahluwalia et al. 2014).

Rhodotorula glutinis (Rg) and *Rhodotorula mucilaginosa* (Rm) are pigmented yeasts, important in the food industry, found in many parts of the world and can be isolated from different substrates, like soil, water, wood and decomposing fruits (Aksu and Eren 2005, 2007). They produce important pigments such as β -carotene, γ -carotene, torulene and lycopene (Hernández-Almanza et al. 2014). They also present big potential in the biodiesel industry, because they are able to convert the main sub product of the biodiesel industry, glycerol, into carotenoids (Cutzu et al. 2013).

Among AgNPs functionalities, the catalytic activity must be highlighted, mainly because effective and ecologically friendly catalysts for the degradation of pollutants are a necessity for present times. Examples are the catalytic reduction of 4-nitrophenol (4-NP) (Ansari et al. 2013) and methylene blue (MB) (Aziz et al. 2015). 4-NP is a compound present in effluents from chemical industries that produce insecticide, medicines and inks. This compound presents high toxicity for animals by harming mitochondria. As it is soluble in water, 4-NP contaminates water and soil collections (Edison and Sethuraman 2013). MB is an organic sulfonated dye that may present acute toxicity (Uddin et al. 2009). MB can be reduced by strong reducer agents like NaBH_4 in order to form organic molecules. However, the reaction is too slow (Suvith and Philip 2014), and this factor alone reveals the need of a

peptone (Himedia-India), glucose (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%), agar potato-glucose (Himedia-India), NaCl (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%), Mueller–Hinton medium agar (Himedia-India), 4-nitrophenol (4-NP) (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%), methylene blue (MB) (Dinâmica-São Paulo-Brazil—purity > 99%) and fluconazole (Sigma—United States) were purchased and used without purification and its fundamental properties were assured by the manufacturers.

Isolating and identifying yeasts

Rhodotorula glutinis and *Rhodotorula mucilaginosa* were isolated from the soil around the Pici Campus, Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-Ceará-Brazil); Latitude: 3°44'20.832"S, Longitude: 38°34'12.483"W; and 3°44'21.750"S, 38°34'12.350"W, respectively. 50.0 g of soil were collected and transported, in plastic bags placed in thermal boxes, to the Microbiology Laboratory of Yeasts of the Department of Clinical and Toxicological Analysis from the Universidade Federal do Ceará. Samples were diluted in NaCl 0.9% and added to an aqueous medium containing MGYD [malt extract (0.3%), glucose (1%), yeast extract (0.3%), peptone (0.5%); antibiotics, pH 7] and incubated 25 °C/72 h. After growth, the samples were inoculated on potato glucose agar and maintained at 25 °C/72 h. Yeasts suggested to belong to the *Rhodotorula* genus were seeded again on potato-glucose agar to obtain an isolated and pure strain. The identification of genus and species was carried out in the automated system VITEC®2 from BioMérieux® S.A., YST card.

Biosynthesis of AgNPs

Two yeasts were selected, *R. glutinis* (Rg) e *R. mucilaginosa* (Rm), after isolation and identification. The yeasts grow in Erlenmeyer flasks of 500.0 mL containing 200.0 mL of MGYP at 25 °C/72 h. After growth, the fungal biomass was centrifuged at 4,000 rpm for 10 min and washed three times in order to remove wastes from the culture medium. Immediately after washing, the yeasts were weighted (5.0 g, humid weight) and put in an Erlenmeyer flask with 100.0 mL of autoclaved deionized water for 48 h at 25 °C without agitation. After this time, the suspensions containing yeasts were filtered with a 0.45 µm membrane. To 90.0 mL the filtrate was added 10.0 mL of 10 mM AgNO₃, final concentration 1 mM AgNO₃, and they were incubated at 25 °C/168 h. Aliquots were removed in 24-h intervals and tests were conducted to assess AgNPs formation. The positive control contained only the yeast extract without AgNO₃ and the negative control contained only the solution of 1 mM AgNO₃. Samples were named Rg and Rm AgNPs.

Purification of AgNPs

After 168 h of reactions, the AgNPs were purified by centrifuging the suspension at 10,000 rpm for 20 min in a HIMAC CS150NX ultracentrifuge. The solid waste was washed three times with deionized water then dried in a desiccator. The residue was used for the following characterization phases.

Characterization of AgNPs

The light absorption spectrum of Rg and Rm AgNPs were performed using a UV-Vis spectrophotometer (Thermo

Rg and Rm AgNPs were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The samples were prepared by pouring a drop of a diluted suspension of silver nanoparticles on carbon-coated copper grids and by allowing water to evaporate. The shape and size of nanoparticles were determined from TEM micrographs. The software (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA) for the digital TEM camera was calibrated for size measurements of the nanoparticles. TEM measurements were performed on a JEOL model 1200EX. The atomic force microscopy (AFM) analyses were performed using a Multimode Nanoscope IIIa (Bruker, CA, USA), in tapping mode (or intermittent mode). In this scanning mode, the AFM tip approaches the sample surface (but does not touch it) with beats of similar amplitude to the resonance amplitude of the AFM cantilever. In this way, we avoid the action of lateral forces between the tip and delicate samples, preventing it to be dragged on the substrate surface or damaged in sample surface. We use a rectangular probe model TESPA7 (Veeco) with nominal spring constant of $k = 20\text{--}80$ N/m and resonance frequency of 291–326 kHz. The scan parameters for the image acquisition were 0.5 Hz of scan rate and 512×512 lines of resolution.

Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) was carried out to determine the resulting Ag concentration in each AgNPs solutions. In the preparation for ICP-OES, the samples were first digested in a solution of HNO₃ and HCl. A 20.0 µL of each sample was diluted to 1.0 mL with water and then heated to 80 °C in a covered test tube. To this, 1 mL of HNO₃ was added, and the mixture was allowed to sit for 1 h at 80 °C. HCl (2 mL) was then added to form aqua regia, and the mixture was allowed to sit for an additional hour. Following cooling, the solutions were dispersed into 10 mL of water in a volumetric flask.

ACS Omega

Article

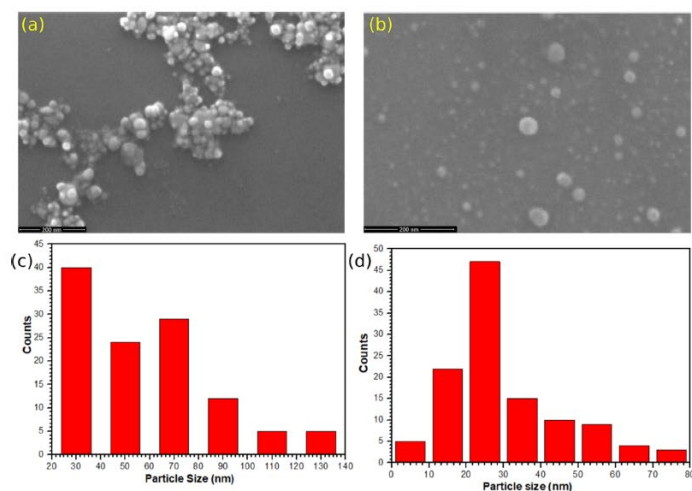


Figure 2. (a) *R. glutinis* AgNP SEM image and (c) size histogram. (b) *R. mucilaginosa* AgNP SEM image and (d) size histogram.

For the Raman and AFM measurements, 10 mL of the suspension of the stored nanoparticles was taken and sonicated for 20 min after addition of 10 mL of deionized water (i.e., diluted AgNP suspension). With a micropipette, one drop was

3. RESULTS AND DISCUSSION

The SEM technique is a versatile tool that has already been successfully employed to characterize fungal AgNPs.^{16–19} Figure 2 presents SEM images on a silicon substrate of the

Метод визначення концентрації біомаси

2.7. Determination of total carotenoids

In the analysis of total carotenoids (TC), the [Lichtenthaler \(1987\)](#) methodology was used with adaptations. 40 mL of the fermented product were collected, washed twice with the distilled water, centrifuged at $12.096 \times g/10\text{min}$ at 20°C , and dried in an oven at $40^\circ\text{C}/12\text{ h}$. 50 mg sample, 2 mg calcium carbonate and 2 mL 80% acetone were added. For analysis of the fermented broth, 2 mL of the fermented medium were collected and the same extraction was followed with 80% acetone. After homogenization, the material was filtered and the content retained on the filter was washed twice with 80% acetone. Spectrophotometer reading of samples at wavelengths of 646.8, 663.2, 470 and 454 nm were taken, according to the following equations: Chlorophyll *a* (C_a) = $12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8}$; Chlorophyll *b* (C_b) = $21.5 \times A_{646.8} - 5.10 \times A_{663.2}$ and Total Carotenoids = $[100 \times A_{470} - (1.82 \times C_a - 104.96 \times C_b)]/198$.

2.8. Determination of pH, biomass and reducing sugars

The determination of pH was made from direct reading in a pHmeter (Thermo Scientific, Orion 3 Star). Biomass determination was carried out following the methodology of [Moreira et al. \(2018\)](#), with modifications. 40 mL of the fermented product were collected, washed twice with distilled water and centrifuged at $12.096 \times g/10\text{min}$ at 20°C , and quantified by drying at 60°C in an oven until constant mass (average of 12 h). For the analysis of glucose, the DNS methodology (3,5-dinitrosalicylic) was used, according to [Vasconcelos, Pinto, and Aragão \(2013\)](#) and [Maldonado, Carvalho, and Ferreira \(2013\)](#), and absorbance measured in a spectrophotometer at 540 nm. For quantification, a calibration curve with concentrations varying from 0.1 to 0.91 g/L was constructed, resulting in an equation

$$1y = 1.027x + 0.0477 \text{ with a correlation coefficient of } 0.986$$

proposed by [Oliveira, Aquino, Ribeiro, Proença, and Pinheiro-Sant'Ana \(2011\)](#) with adaptations. To quantify the analytical standards, external calibration curves were constructed (Table SM.2). Results were expressed in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$.

2.11. Identification and quantification of organic acids using HPLC-DAD system

The equipment used was a High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with UV-DAD diode array detection system (Shimadzu Corporation, Japan). The column used was Shimadzu's VP-ODS C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), using a flow rate of 1 mL/min and at a temperature of 40°C . The injection volume was 5 μL , in an isocratic elution mode, with a mobile phase consisting of a mixture of monobasic sodium phosphate (0.01 mmol/L) of pH 2.5, acidified with phosphoric acid and acetonitrile (99:1, v/v), with a running analytical time of 30 min, the methodology of [Lee \(1993\)](#), with modifications). For quantitation, external calibration curves were constructed for each analytical standard (Table SM.3). The results were expressed in $\text{mg}/100\text{ mL}$ of the fermented medium (FM).

2.12. Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate and the results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The Tukey test was performed to verify any difference between the treatments from their mean values. Experimental data were submitted to the Response Surface Methodology (MSR) and the Desirability function ([Derringer & Suich, 1980](#)), using the Statistica 12.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Linear, quadratic and interaction effects of the three variables considered in the response variables were calculated. The significance of the generated models was tested by analysis of variance (ANOVA), F value ($p \leq 0.05$) and the value of the coefficient of determination (R^2) of the model.

3. Results and discussion

Ак
ЧТ
"Пі

Методи характеристики наночасток срібла

Biosynthesis of AgNPs

Two yeasts were selected, *R. glutinis* (Rg) e *R. mucilaginosa* (Rm), after isolation and identification. The yeasts grow in Erlenmeyer flasks of 500.0 mL containing 200.0 mL of MGYP at 25 °C/72 h. After growth, the fungal biomass was centrifuged at 4.000 rpm for 10 min and washed three times in order to remove wastes from the culture medium. Immediately after washing, the yeasts were weighted (5.0 g, humid weight) and put in an Erlenmeyer flask with 100.0 mL of autoclaved deionized water for 48 h at 25 °C without agitation. After this time, the suspensions containing yeasts were filtered with a 0.45 µm membrane. To 90.0 mL the filtrate was added 10.0 mL of 10 mM AgNO₃, final concentration 1 mM AgNO₃, and they were incubated at 25 °C/168 h. Aliquots were removed in 24-h intervals and tests were conducted to assess AgNPs formation. The positive control contained only the yeast extract without AgNO₃ and the negative control contained only the solution of 1 mM AgNO₃. Samples were named Rg and Rm AgNPs.

Purification of AgNPs

After 168 h of reactions, the AgNPs were purified by centrifuging the suspension at 10,000 rpm for 20 min in a HIMAC CS150NX ultracentrifuge. The solid waste was washed three times with deionized water then dried in a desiccator. The residue was used for the following characterization phases.

Characterization of AgNPs

The light absorption spectrum of Rg and Rm AgNPs were performed using a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific GENESYS™ 10 s), in the 200–700 nm wavelength range. The size of the AgNPs was assessed using dynamic light scattering (DLS). Measurements were made using a Zetasizer Nano ZS, (Malvern Instruments in United Kingdom). The solid waste of dry AgNPs produced by Rg

Rg and Rm AgNPs were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The samples were prepared by pouring a drop of a diluted suspension of silver nanoparticles on carbon-coated copper grids and by allowing water to evaporate. The shape and size of nanoparticles were determined from TEM micrographs. The software (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA) for the digital TEM camera was calibrated for size measurements of the nanoparticles. TEM measurements were performed on a JEOL model 1200EX. The atomic force microscopy (AFM) analyses were performed using a Multimode Nanoscope IIIa (Bruker, CA, USA), in tapping mode (or intermittent mode). In this scanning mode, the AFM tip approaches the sample surface (but does not touch it) with beats of similar amplitude to the resonance amplitude of the AFM cantilever. In this way, we avoid the action of lateral forces between the tip and delicate samples, preventing it to be dragged on the substrate surface or damaged in sample surface. We use a rectangular probe model TESPA7 (Veeco) with nominal spring constant of $k = 20\text{--}80$ N/m and resonance frequency of 291–326 kHz. The scan parameters for the image acquisition were 0.5 Hz of scan rate and 512×512 lines of resolution.

Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) was carried out to determine the resulting Ag concentration in each AgNPs solutions. In the preparation for ICP-OES, the samples were first digested in a solution of HNO₃ and HCl. A 20.0 µL of each sample was diluted to 1.0 mL with water and then heated to 80 °C in a covered test tube. To this, 1 mL of HNO₃ was added, and the mixture was allowed to sit for 1 h at 80 °C. HCl (2 mL) was then added to form aqua regia, and the mixture was allowed to sit for an additional hour. Following cooling, the solutions were dispersed into 10 mL of water in a volumetric flask.

Catalytic activity of AgNPs

The catalytic activity of biogenic AgNPs with NP-4 was based on the protocol described by Narayanan et al. (2013).

Ак
что
"Па

Глюкозооксидазний метод для глюкози

ування були визначені в ході експериментальних досліджень.

До 0,9 мл розробленого субстрату додавали 0,1 мл суспензії бактерій (дослідні проби) з оптичною щільністю 1,0 одиниць за McFarland або 0,1 мл фізіологічного розчину (контрольна проба) та інкубували впродовж 3-24 годин при температурі 37 °C, центрифугували 10-15 хв. при 3000 об./хв., відбирали супернатант, в якому глюкозооксидазним методом за допомогою відповідних комерційних наборів визначали кількість глюкози.

Аналіз проводився у відповідності зі схемою:

Назва речовини	Калібрувальна або дослідна проба, метод дослідження			Холоста проба, метод дослідження		
	макро	напів-мікро	мікро	макро	напів-мікро	мікро
Калібрувальний розчин або супернатант, мл	0,04	0,02	0,01	-	-	-
Фізіологічний розчин, мл	-	-	-	0,04	0,02	0,01
Буферний розчин, мл	2,0	1,0	0,5	2,0	1,0	0,5
Ензими, мл	2,0	1,0	0,5	2,0	1,0	0,5

Суміш ретельно змішати, витримати 20 хв. при кімнатній температурі (18-25 °C), або 12 хв. при температурі 37 °C. Після чого вимірюють оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{кал}}$) та дослідної ($E_{\text{досл}}$) проти холостої проби при довжині хвилі 500-550 нм та довжині оптичного шляху 5-10 мм.

Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою:

Ензими, мл	2,0	1,0	0,5	2,0	1,0	0,5
------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Суміш ретельно змішати, витримати 20 хв. при кімнатній температурі (18-25 °C), або 12 хв. при температурі 37 °C. Після чого вимірюють оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{кал}}$) та дослідної ($E_{\text{досл}}$) проти холостої проби при довжині хвилі 500-550 нм та довжині оптичного шляху 5-10 мм.

Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою:

$$C = \frac{10 \times K \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \text{ (ммоль/л)}$$

де, C – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л;

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л;

$E_{\text{досл}}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

K – коефіцієнт розведення (при необхідності).

Кількість розщепленої мікроорганізмами глюкози визначали за різницею між кількістю глюкози в контрольній і дослідних пробах.

Досліди проводили в 3-5 повторюваннях. Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики як викладено у посібниках [2, 11].

Результати досліджень та їх обговорення. У ході проведених досліджень встановлено, що розроблений спосіб, заснований на визначенні концентрації глюкози у субстраті глюкозооксидазним методом, є цілком придатним для оцінки рівня метаболічних процесів мікроорганізмів за показниками кількості утилізованої глюкози та за швидкістю її утилізації.

Можливість застосування вказаного методу для визначення катаболічної активності мікроорганізмів ілюструємо на нижченаведених прикладах (табл. 1, табл. 2).

Таблиця 1
Визначення кількості спожитої глюкози
***S. aureus* ATCC 25923**

Проба	Кількість глюкози, ммоль/л		Різниця, ммоль/л
	до інкубації	після інкубації	
Контрольна	33,908	33,908	0
Дослідна	33,908	32,025	1,883

Дані таблиці розраховані за формулою наступним чином:

вміст глюкози в дослідній пробі:

$$C_{\text{досл}} = \frac{10 \times 1,762}{0,5502} = 32,025 \text{ (ммоль/л)};$$

вміст глюкози в контрольній пробі:

$$C_{\text{конт}} = \frac{10 \times 1,866}{0,5502} = 33,908 \text{ (ммоль/л)};$$

Таким чином, кількість глюкози, спожитої культурою *S. aureus* ATCC 25923 становить: $C_{\text{конт}} - C_{\text{досл}} =$

ним чином:

вміст глюкози в дослідній пробі:

$$C_{\text{досл}} = \frac{10 \times 1,762}{0,5502} = 32,025 \text{ (ммоль/л)};$$

вміст глюкози в контрольній пробі:

$$C_{\text{конт}} = \frac{10 \times 1,866}{0,5502} = 33,908 \text{ (ммоль/л)};$$

Таким чином, кількість глюкози, спожитої культурою *S. aureus* ATCC 25923 становить: $C_{\text{конт}} - C_{\text{досл}} = 33,908 - 32,025 = 1,883$ ммоль/л

Тобто, бактерії, які знаходились у дослідній пробі, утилізували за певний час (тривалість інкубації) 1,883 ммоль/л глюкози.

Для вивчення швидкості метаболічного процесу (перебіг якого сприяє життєдіяльності бактерій) кількість утилізованої глюкози було визначено через різні відрізки часу (табл. 2) і на основі отриманих даних побудовано індивідуальні графіки швидкості метаболізму для кожного взятого у дослід штамму (рис.).

Тривалість культивування визначено в діапазоні 3-24 години, оскільки у різних досліджуваних видів мікроорганізмів, за обраних параметрів співвідношення розміру інокуляту та концентрації субстрату, швидкість ферментативних реакцій суттєво відрізнялась.

За отриманими результатами можна зробити висновок про метаболічну активність мікроорганізмів, активацію або пригнічення катаболічних процесів під впливом різноманітних факторів.

Метод біуретової реакції для визначення загального білка

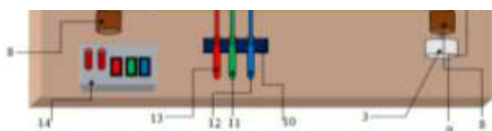


Рис. 1. Пристрій для опромінення міцелію монохроматичним світлом за допомогою LED лазерів.

1 – платформа для кріплення пристрою, 2 – електродвигун 1, 3 – електродвигун 2, 4 – захисна кришка для дзеркальної призми, 5 – дзеркальна призма, 6 – транспортна стрічка, 7 – бункер для опромінених об'єктів, 8 – валик, який рухає транспортну стрічку, 9 – платформа для опромінених об'єктів, 10 – итатив для кріплення LED лазерів, 11 – LED лазер BGP-3010-5 з випромінюванням зеленого спектру з довжиною хвилі 532 нм, 12 – LED лазер BVP-3010-5 з випромінюванням синього спектру з довжиною хвилі 405 нм, 13 – LED лазер BRP-3010-5, з випромінюванням червоного спектру з довжиною хвилі 635 нм, 14 – панель управління.

Міцелій опромінювали у такий спосіб: чашка Петрі з міцелієм рухається на транспортерній стрічці під променем світла зі

інокуляції контрольних чашок Петрі застосовували неопромінену культуру. Опромінення міцелію проводили в декількох варіантах (табл. 1).

Рівень накопичення біомаси визначали ваговим методом, висушуючи міцелій до постійної маси при температурі $(105 \pm 1)^\circ\text{C}$ [8].

Для визначення кількості білка міцелій відділяли від культурального фільтрату за допомогою паперового фільтра. Підготовлений міцелій гриба в кількості 1 г гомогенізували в ступці з додаванням 10 мл дистильованої води (для альбумінів) або 10% розчину NaCl (для глобулінів) та відцентровували в центрифугі при 2500 об/хв. Для визначення кількості білка застосовували метод біуретової реакції. В першу пробірку вносили 0,1 мл дистильованої води (контроль), у другу – 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/дм^3), в інші пробірки – по 0,1 мл досліджуваного розчину білка. У кожену пробірку додавали по 5 мл біуретового реактиву, перемішували, витримували 30 хв при кімнатній температурі. Виміряли оптичну щільність калібрувальної або дослідної проби проти холостої проби, при довжині хвилі (540 – 560 нм) в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності. Аналіз проводили згідно зі схемою (табл. 2).

Таблиця 1

Ак
Чтс
"Па

Особливості синтезу білка у міцелії *Pleurotus ostreatus* за дії лазерного опромінення

Розрахунок концентрації загального білка проводили за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 50, \text{ де:} \quad (1)$$

C – концентрація загального білка в дослідній пробі, г/дм^3 ;

50 – концентрація загального білка в калібрувальному розчині, г/дм^3 ;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності.

Усі дослідні проводили в трикратній повторюваності. Для визначення вірогідності впливу лазерного опромінення на кількість біомаси та білка застосовували метод дисперсійного аналізу. Порівняння середніх значень здійснювали методом Даннета [9]. Обробку проводили за допомогою пакета статистичних програм [10].

191 та P-155 біомаса зростає на 60% та на 53,5% відповідно. Для штамів P-108, P-154 та P-6v показник кількості біомаси зростає від 33,3 до 50% відповідно. Лазерне опромінення червоним світлом довжиною хвилі 635 нм (енергетична доза опромінення $51,1 \text{ мДж/см}^2$) призвело до зростання біомаси для всіх досліджених штамів у межах від 16% до 25%, а для штаму P-155 цей показник збільшився на 35,7%. Опромінення міцелію синім світлом довжиною хвилі 405 нм (енергетична доза опромінення $51,1 \text{ мДж/см}^2$) викликало зростання біомаси міцелію для всіх досліджених штамів *P. ostreatus* в межах від 11,9 до 31,2% відповідно (Рис. 2).

Нами вперше проведено дослідження можливості використання опромінення когерентним світлом різної довжини хвилі як фактора регуляції синтезу білка у міцелії *P. ostreatus*. Зокрема, встановили зростання кількості білка у міцелії *P. ostreatus* за дії лазерного опромінення. Для штаму P-192 гриба

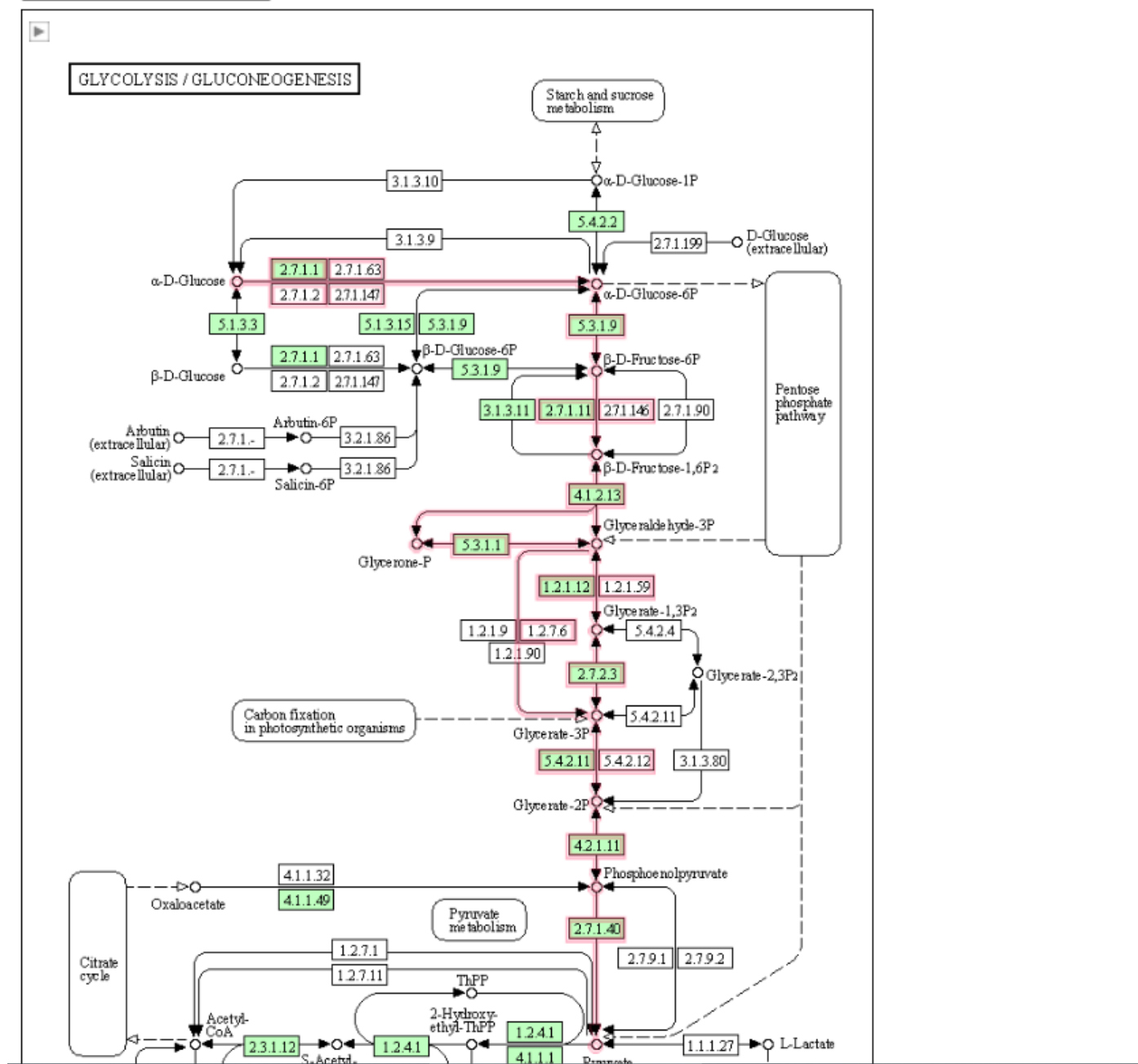
Ак
Чтс
"Па

Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Мєєргофа-Парнаса

Glycolysis / Gluconeogenesis - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

[[Pathway menu](#) | [Pathway entry](#) | [Download KGML](#) | [Show description](#) | [Image file](#) | [Help](#)]

Change pathway type

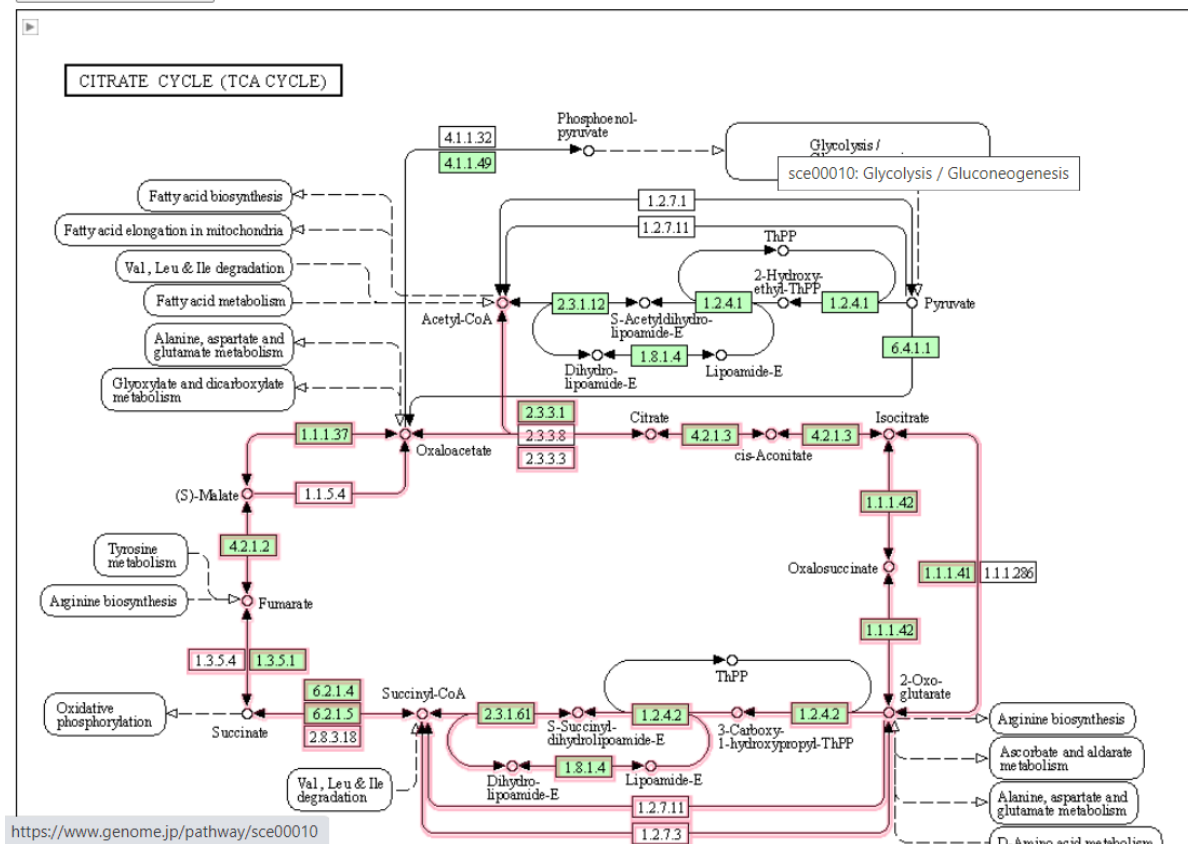


Цикл трикарбонових кислот

Citrate cycle (TCA cycle) - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

[[Pathway menu](#) | [Pathway entry](#) | [Download KGML](#) | [Show description](#) | [Image file](#) | [Help](#)]

[Change pathway type](#)

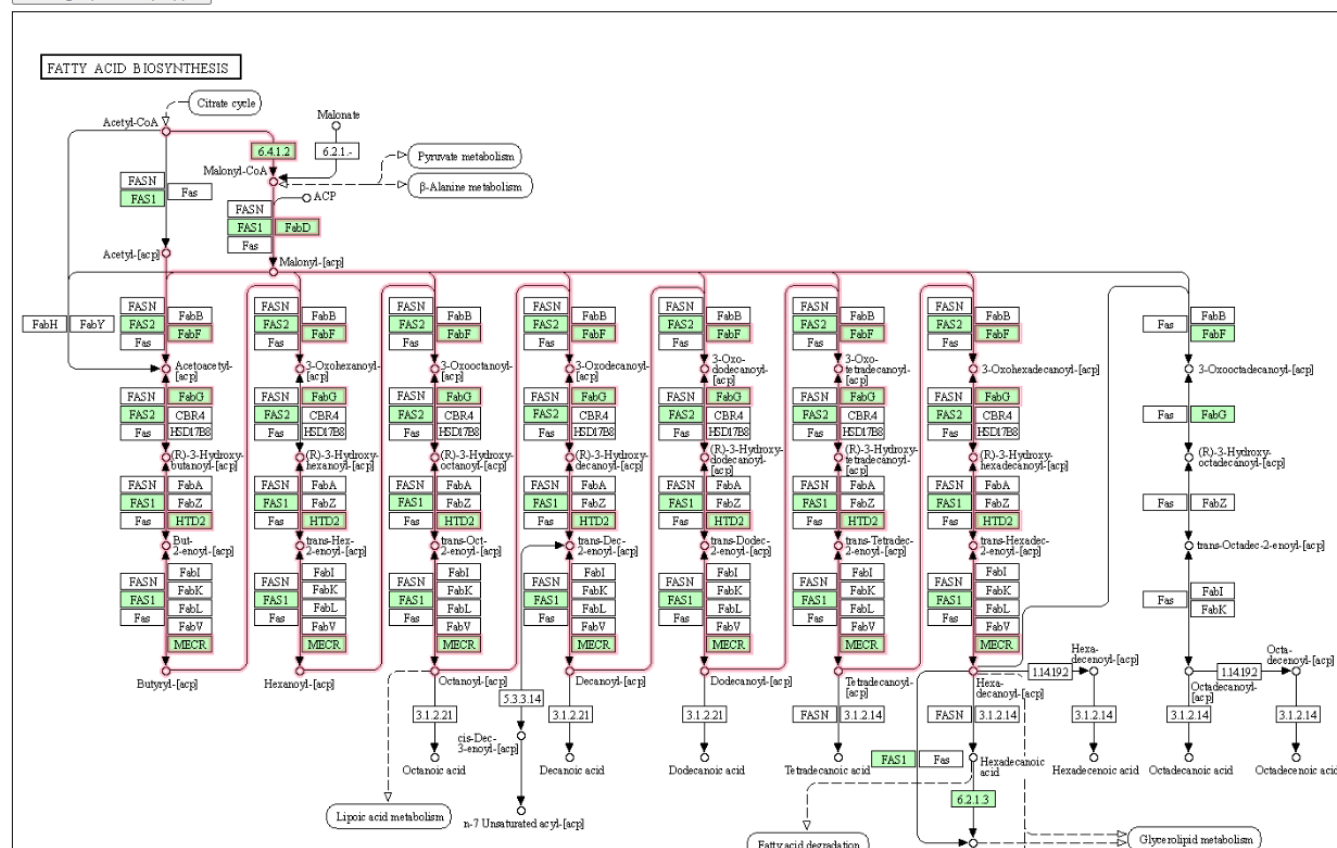


Біосинтез жирних кислот

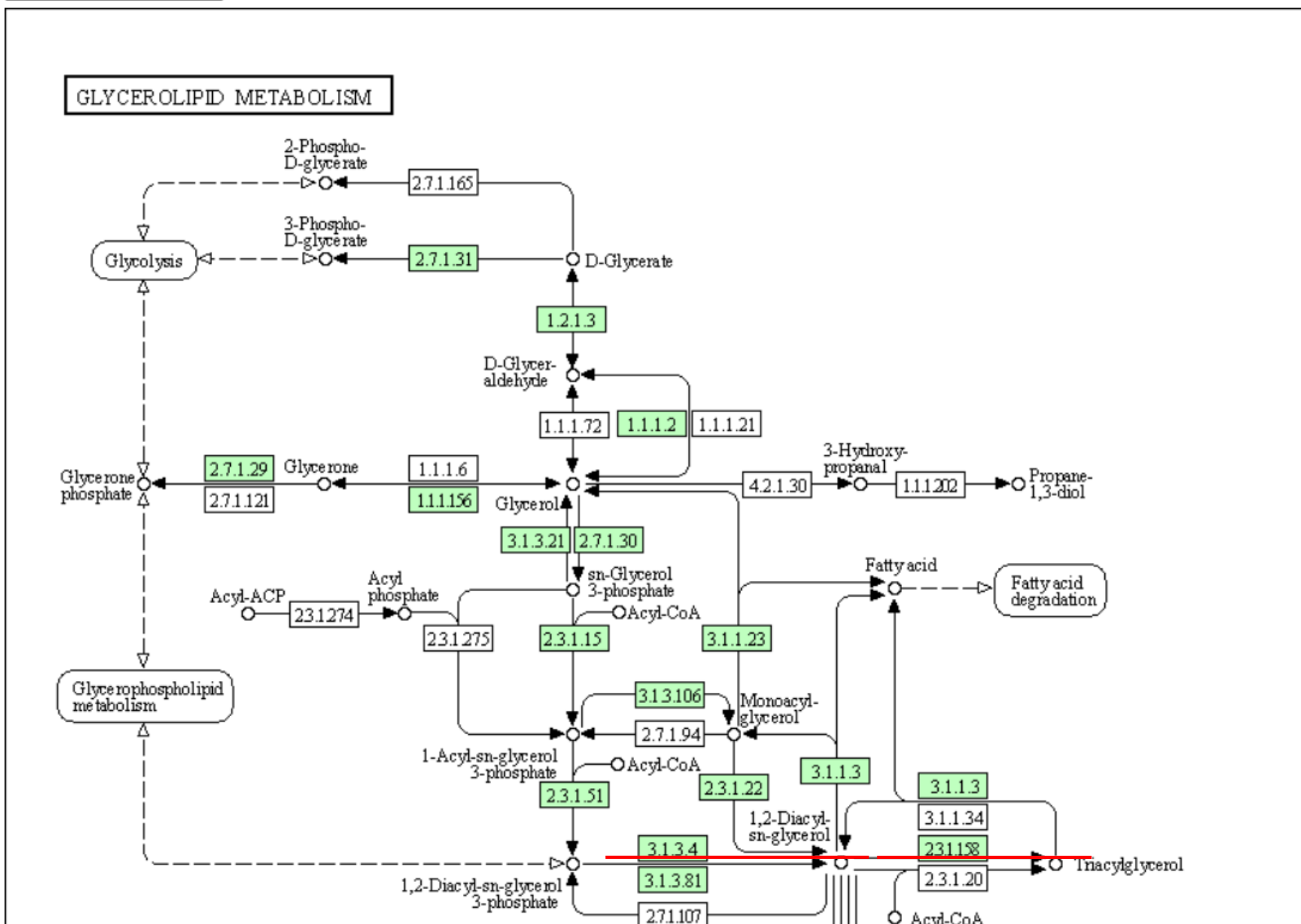
Fatty acid biosynthesis - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

[[Pathway menu](#) | [Pathway entry](#) | [Download KGML](#) | [Image file](#) | [Help](#)]

[Change pathway type](#)





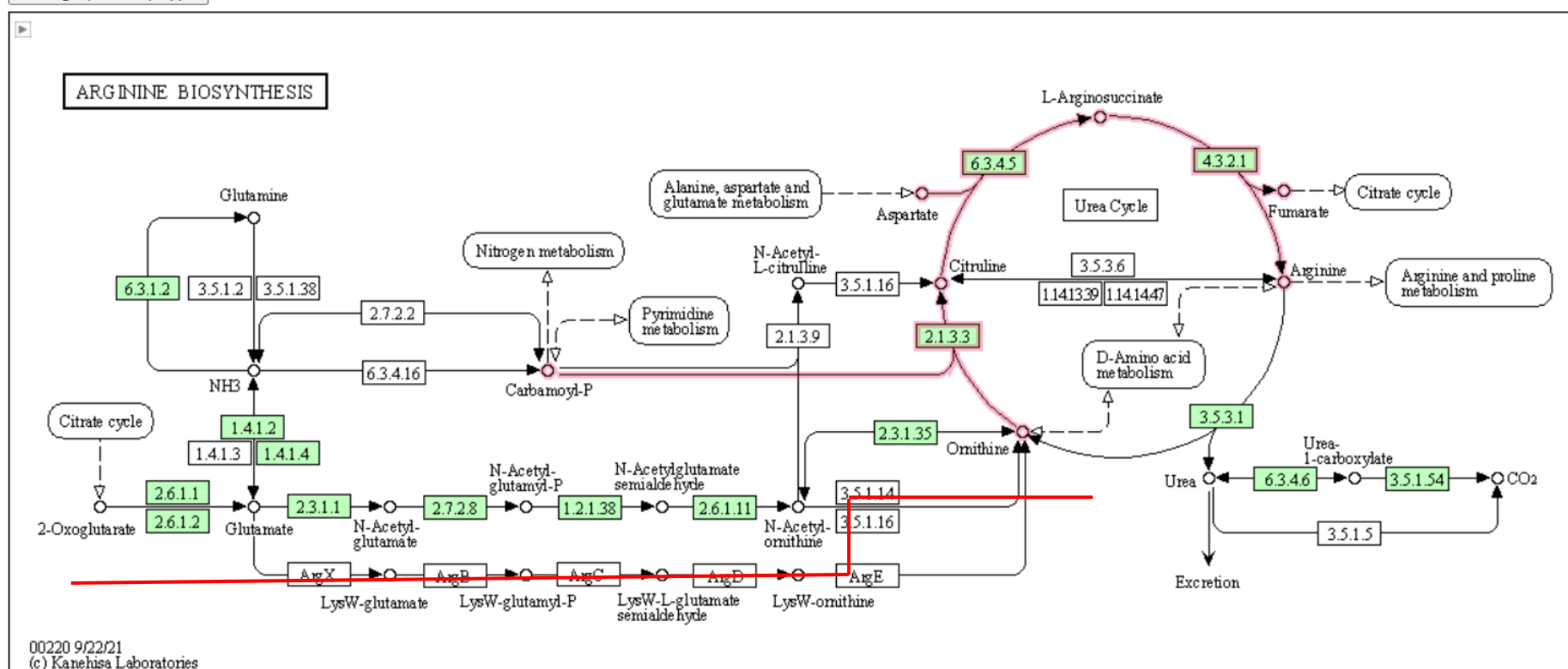


Біосинтез глутамату, глутаміну та аргініну

KEGG Arginine biosynthesis - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image file | Help]

Change pathway type



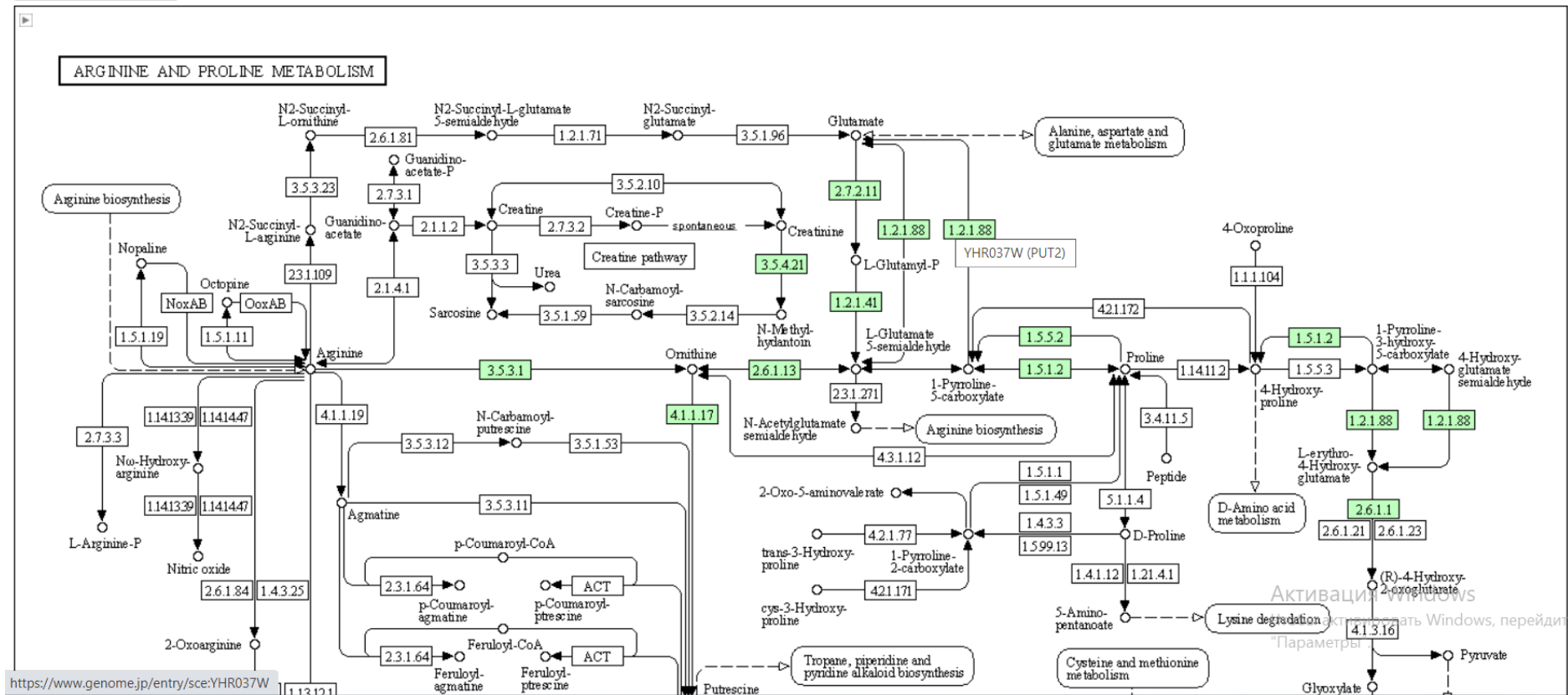
Біосинтез проліну



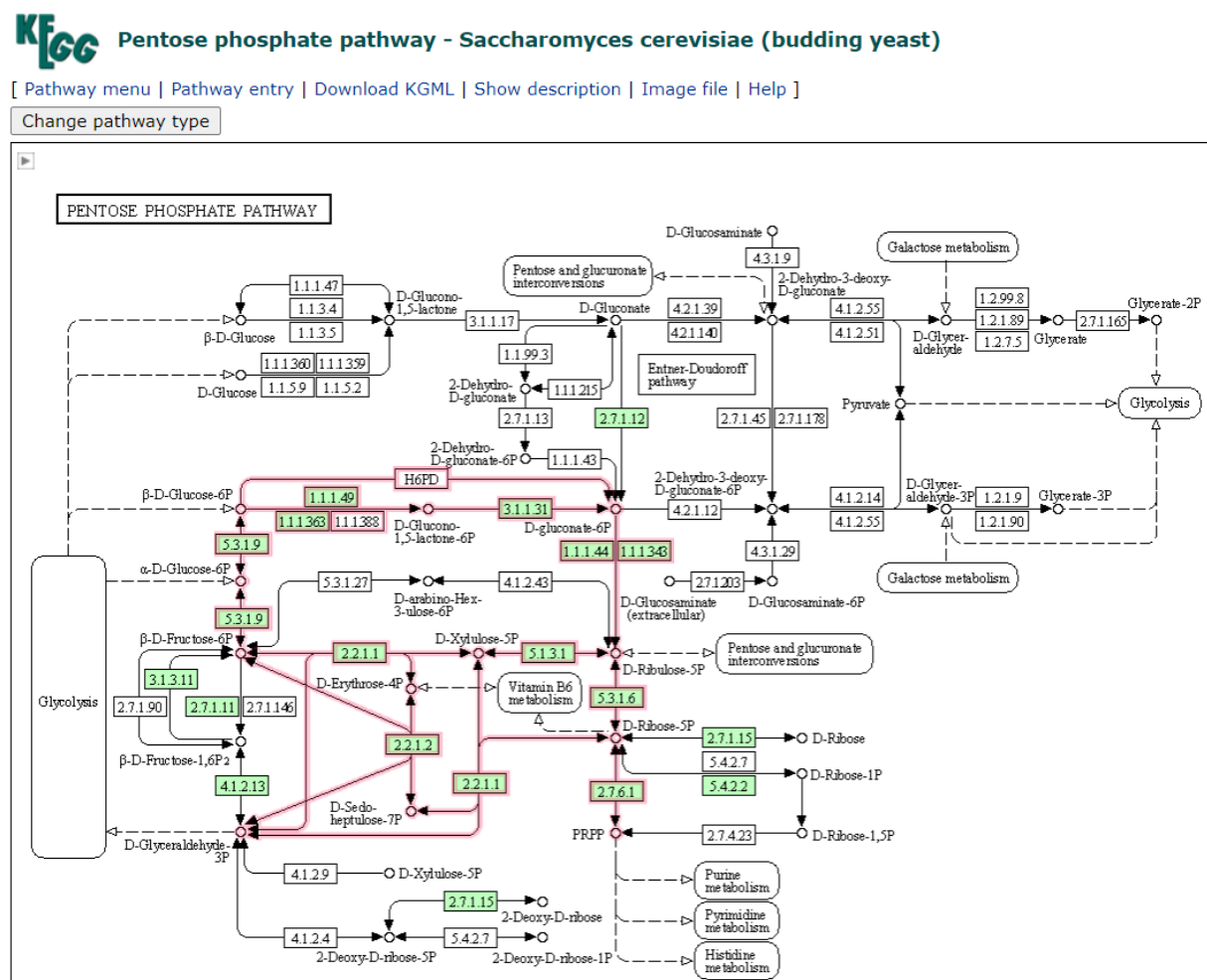
Arginine and proline metabolism - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image file | Help]

Change pathway type



Пентозофосфатный цикл

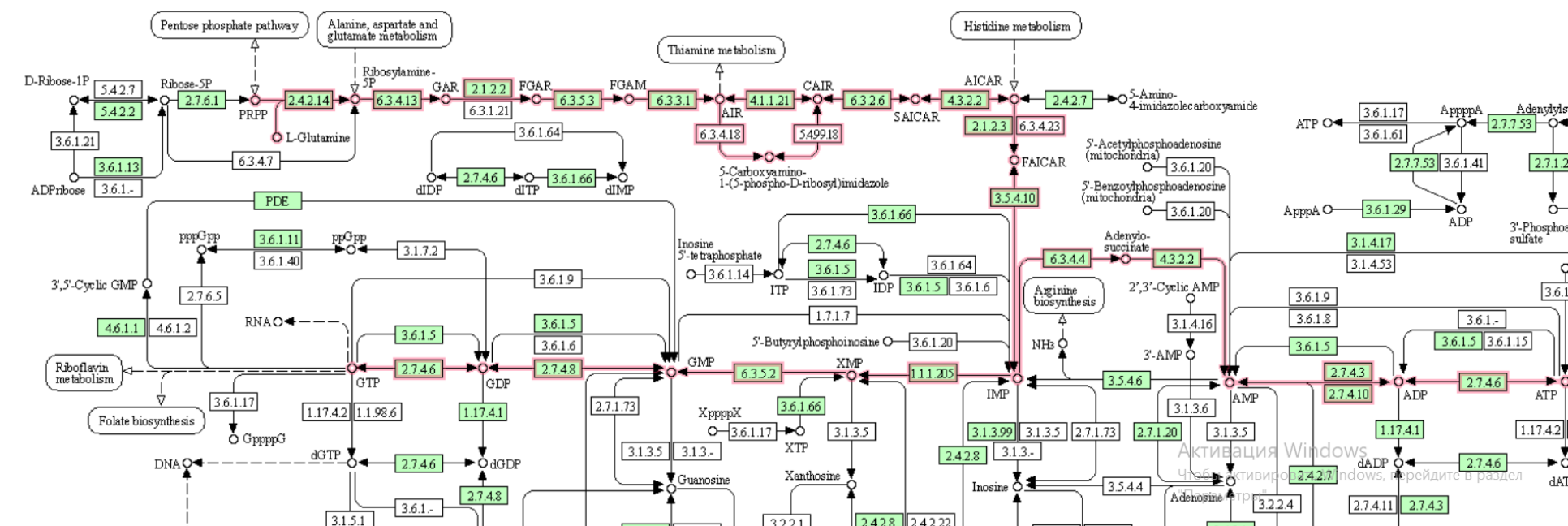


Біосинтез ГТФ та АТФ

Purine metabolism - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

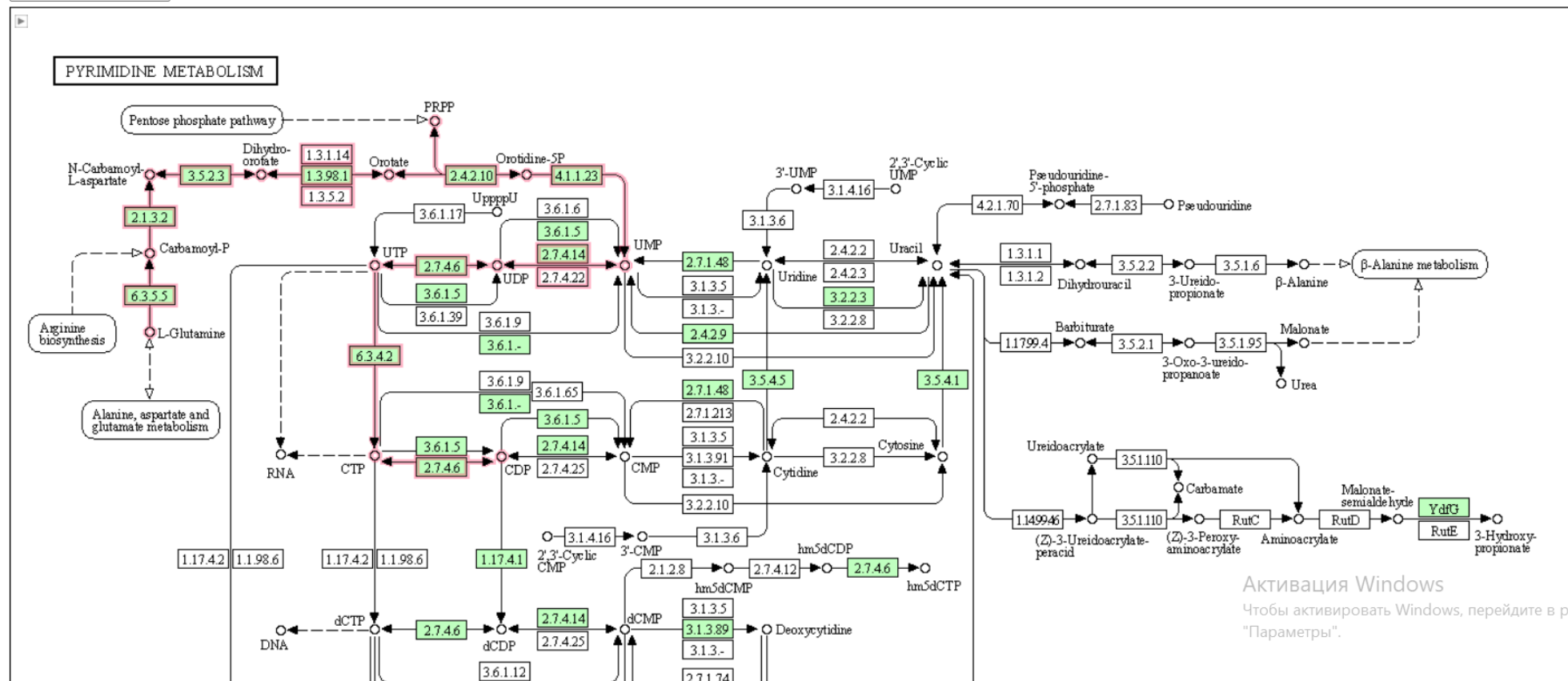
[Pathway menu](#) | [Pathway entry](#) | [Download KGML](#) | [Image file](#) | [Help](#)
[Change pathway type](#)


PURINE METABOLISM



KFCC Pyrimidine metabolism - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

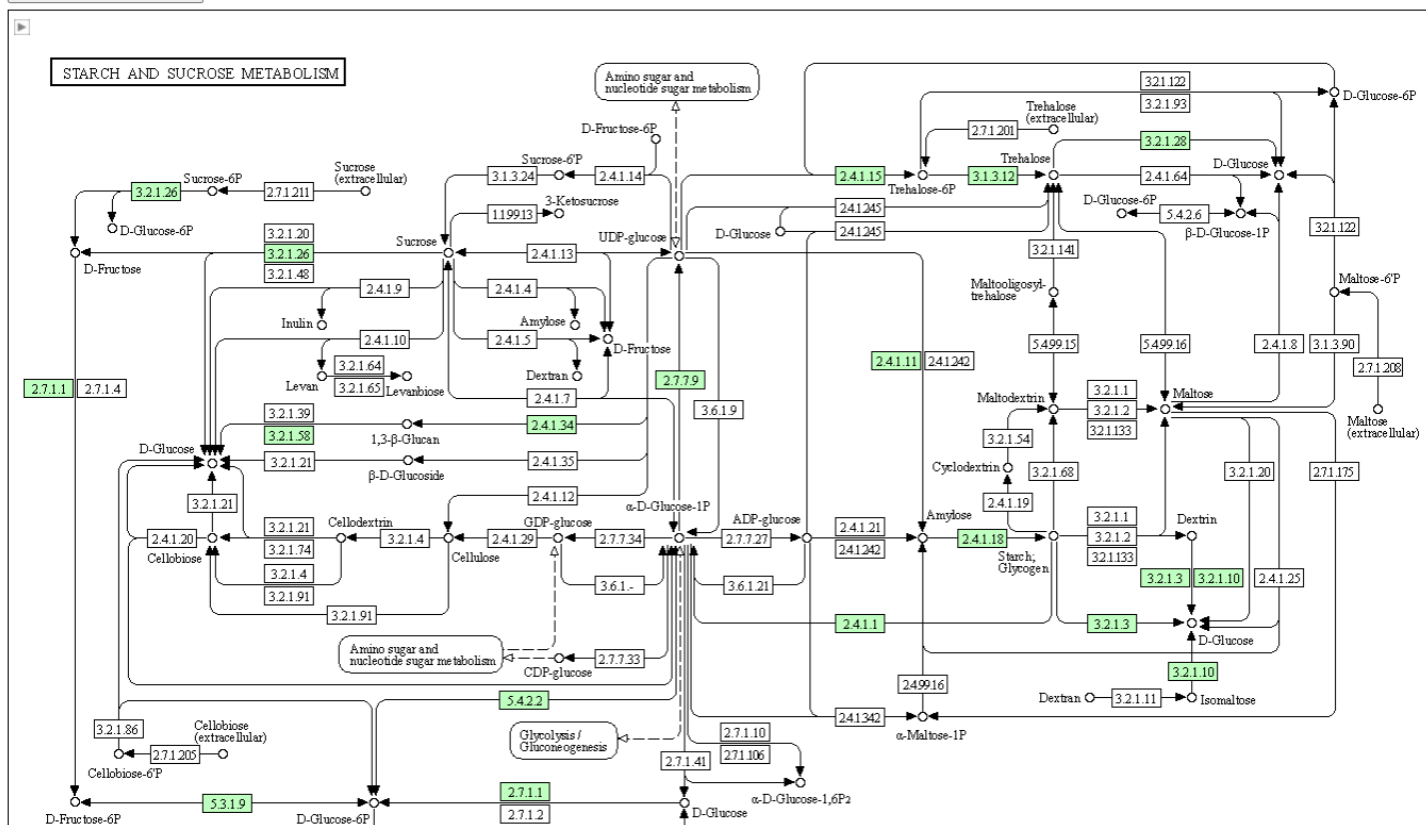
Change pathway type



Біосинтез глюкану

Starch and sucrose metabolism - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)
[\[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image file | Help \]](#)

Change pathway type





Анаплеротичні реакції

Pyruvate metabolism - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)

[[Pathway menu](#) | [Pathway entry](#) | [Download KGML](#) | [Image file](#) | [Help](#)]

Change pathway type

