

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

« » червня 2024 р.

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

« » червня 2024 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 кілер-токсинів *Torulaspota delbrueckii*»

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

ГАФІЙЧУК Андрій Романович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти
(ім'я та прізвище) (підпис)
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Маргарита ЛОМБЕРГ
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 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 СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГАФІЙЧУК Андрій Романович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи « Біосинтез кілер-токсинів *Torulaspora delbrueckii*»

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Torulaspora delbrueckii*, цільовий продукт: кіллер-токсини, сухі дріжджі

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ. РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ. РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ. РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ. РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ. РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КІЛЛЕР-ТОКСИНУ. РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА. РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема одержання *Torulaspora delbrueckii* – 1 аркуші формату А1.
Апаратурна схема одержання *Torulaspora delbrueckii* – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 – 11.03.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.03.2024 – 27.03.2024	
3	Біосинтез цільового продукту	27.03.2024 – 04.04.2024	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	04.04.2024 – 14.04.2024	
5	Специфікація обладнання	16.04.2024 – 01.05.2024	
6	Опис технологічної схеми одержання біомаси	02.05.2024 – 12.05.2024	
7	Контроль виробництва	12.05.2024 – 19.05.2024	
8	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	19.05.2024 – 23.05.2024	
9	Оформлення пояснювальної записки	23.05.2024 – 25.05.2024	
10	Виконання графічної частини проекту	25.05.2024 – 28.05.24	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Андрій ГАФІЙЧУК

(ім'я та прізвище)

Вікторія КРАСІНЬКО

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню біосинтезу кілер-токсинів дріжджів *Torulaspota delbrueckii* та розробці технологічної і апаратурної схем виробництва дріжджів *T. delbrueckii*, що продукують кілер-токсини. У роботі детально описані морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні характеристики досліджуваних дріжджів, а також визначені оптимальні умови для максимального синтезу кілер-токсинів, такі як температура, рН середовища, джерела вуглецю та азоту.

Розглядаються механізми дії кілер-токсинів, їх біосинтез та можливості застосування у харчовій промисловості для контролю дріжджових популяцій. Особлива увага приділена використанню цих дріжджів у виноробстві для забезпечення стабільності та якості винної продукції.

Кваліфікаційна робота викладена на 114 сторінках, містить 13 таблиць, 12 рисунків, складається з переліку умовних позначень, вступу, дев'ять розділів, списку використаної літератури, додатків, апаратурної та технологічної схем.

Ключові слова: дріжджі *Torulaspota delbrueckii*, кілер-токсини, біосинтез, протимікробні засоби, виноробство.

ABSTRACT

The qualification work is dedicated to the study of the biosynthesis of killer toxins by the yeast *Torulaspora delbrueckii* and the development of technological and apparatus schemes for the production of *T. delbrueckii* yeast that produce killer toxins. The work provides a detailed description of the morphological, cultural, and physiological-biochemical characteristics of the studied yeasts, as well as the determination of optimal conditions for the maximum synthesis of killer toxins, such as temperature, pH of the medium, carbon, and nitrogen sources.

The mechanisms of action of killer toxins, their biosynthesis, and the possibilities of their application in the food industry for controlling yeast populations are considered. Particular attention is paid to the use of these yeasts in winemaking to ensure the stability and quality of wine products.

The qualification work is presented on 114 pages, contains 13 tables, 12 figures, and consists of a list of abbreviations, an introduction, nine chapters, a list of references, appendices, as well as apparatus and technological schemes.

Keywords: *Torulaspora delbrueckii* yeast, killer toxins, biosynthesis, antimicrobial agents, winemaking.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1 Коротка інформація про штами дріжджів	14
2.2 Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів кіллер-токсинів	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Torulaspora delbrueckii</i>	18
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	20
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	21
3.1 Потреба в цільовому продукті – кіллер-токсин	21
3.2 Розрахунок теоретично можливого рівня біомаси.	22
3.3. Розрахунок потужності виробництва.....	23
3.4. Розрахунок геометричного об'єму ферментера	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	29
4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у <i>Torulaspora delbrueckii</i>	29
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	31
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	37
5.1. Вибір умов і способу культивування <i>Torulaspora delbrueckii</i> '.....	37
5.2. Вибір типу ферментера для культивування <i>Torulaspora delbrueckii</i>	38
5.3 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.	39
5.4 Обґрунтування вибору мийних та дезинфікуючих засобів.....	41
5.5 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу і виробничого синтезу кіллер-токсинів	49
5.5.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках	50
5.5.2. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л.....	50
5.5.3. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л.....	51
5.5.4. Вирощування інокуляту у ферментері об'ємом 1000 л	52
5.6.Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	53
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	54
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КІЛЛЕР-ТОКСИНУ.....	58
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	67

8.1 Ідентифікація ізолятів дріжджів	67
8.2 Морфологічна характеристика	68
8.3 Біохімічна характеристика	68
8.4 Ферментація вуглеводів.....	69
8.5 Методи визначення концентрації життєздатних клітин дріжджів	69
8.6 Метод визначення вологості в сухих дріжджах діелектричним методом ..	70
8.7 Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ	71
8.8. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	71
8.9 Якісний метод визначення кіллер-токсина (QLM).....	73
8.10 Визначення концентрації джерела вуглецю	73
8.11 Визначення концентрації джерела азоту.	74
8.12 Карта постадійного контролю біосинтезу кіллер токсинів.....	75
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	79
9.1. Системи знешкодження рідких відходів	79
9.1.1. Розрахунок орієнтовного об'єму стічних вод.....	79
9.1.2. Визначення середніх витрат стічних вод промислового підприємства	80
9.1.3. Система очищення стічних вод	82
9.2. Система знешкодження газоподібних відходів	84
9.3. Система знешкодження твердих відходів	85
СПРИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	86
ДОДАТКИ.....	92

ВСТУП

Дріжджові кіллер-токсини – це білкові токсини, які зазвичай глікозилізовані та зв'язуються зі специфічними рецепторами на поверхні мікроорганізмів-мішеней. Ці токсини виробляються певними штамми дріжджів і знищують інші мікроорганізми, які не можуть їх продукувати. Штами дріжджів можуть виробляти один або кілька типів токсинів, що діють різними механізмами, включаючи пригнічення синтезу ДНК або ергостеролу та зміну проникності клітинної мембрани [1].

Такі токсини мають значний потенціал як природні протимікробні засоби у харчових продуктах та для біологічного контролю рослинних патогенів. Наприклад, вони допомагають зберігати якість вина, запобігаючи його псуванню, що особливо важливо під час тривалого зберігання. Виноробство, як важлива складова сільськогосподарського сектору, значно впливає на економіку та культуру. Український ринок вина демонструє стійкий ріст, стимулюючи впровадження нових технологій, зокрема кіллер-токсинів, як перспективної альтернативи хімічним засобам.

Дріжджові кіллер-токсини складаються з двох компонентів: α -пептиду, що забезпечує специфічну активність токсину, та β -пептиду, який допомагає транспортувати α -пептид до клітин, що мають бути вбиті. Гени, що кодують ці токсини, можуть бути локалізовані в ядрі або на цитоплазматичних дволанцюгових молекулах ДНК або РНК вірусного походження [2].

Токсини-кіллери можна використовувати для боротьби з дріжджами-паразитами в харчовій промисловості, такими як *Pichia*, *Brettanomyces* та *Candida*. Вони можуть бути використані як альтернатива традиційним методам

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Гафійчук А.Р.			Вступ	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Красінько В.О.					8	2
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

консервування, таким як використання хімічних консервантів, а також для боротьби зі шкідливими дріжджами у виноробстві та пивоварінні.

Крім того, дріжджові кіллер-токсини мають потенціал для боротьби з грибковими інфекціями у людей, такими як кандидоз та молочниця, але їх використання у медицині залишається експериментальним і потребує додаткових досліджень. У сільському господарстві ці токсини можуть використовуватися для захисту рослин від хвороб, таких як пліснява, фузаріоз і борошниста роса, оскільки вони не є токсичними для людей та тварин і не мають негативного впливу на навколишнє середовище [3].

У лабораторіях дріжджові кіллер-токсини можна використовувати як інструмент для вивчення механізмів клітинного вбивства та дослідження мутацій дріжджів, які забезпечують стійкість до цих токсинів.

Виноробство є важливою складовою галуззю сільськогосподарського сектору, що впливає на економіку та культуру країн світу. У сучасних умовах виноробство стало об'єктом підвищеного інтересу. За останні роки український ринок вина демонструє стійкий ріст. Стрімкий розвиток виноробства стимулює впровадження нових технологій та інновацій, які включають використання сучасних методів вирощування винограду та нових методів збереження продукції. Однією з таких перспективних технологій є використання кіллер-токсинів замість традиційних хімічних засобів, що використовуються для пригнічення небажаної мікробіоти [1].

Отже, дріжджові кіллер-токсини є важливим інструментом у біологічних дослідженнях, медицині, сільському господарстві та харчовій промисловості. Їх використання може мати переваги порівняно з традиційними методами, проте слід забезпечити правильне дозування та застосування, а також проводити додаткові дослідження для забезпечення безпеки та ефективності. Використання кіллер-токсинів у виноробстві не тільки сприяє захисту вина від небажаних мікроорганізмів, але й впливає на його загальну якість, стабільність та збереження властивостей протягом тривалого періоду зберігання [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Усі відомі токсини-кілери, що виробляються дріжджами-кілерами, є білками, які вбивають чутливі клітини через двоступеневий спосіб дії [6]. Це вище було виявлено серед багатьох різних родів дріжджів. Потенційна здатність певних дріжджів-кілерів вбивати інші чутливі дріжджі вперше спостерігали у штамів *Saccharomyces cerevisiae* [5]. Дріжджі-вбивці виділяють позаклітинний білковий токсин, який є смертельним для чутливих дріжджів і вбиває останніх [7]. Дріжджі, що виробляють токсин-убивцю, мають імунітет до власного токсину, але можуть вбивати інші чутливі дріжджі, використовуючи різноманітні механізми, наприклад, націлюючись на кілька клітинних компонентів, а саме: клітинна стінка, плазматична мембрана, тРНК, ДНК тощо [5].

Відкриття токсинів-убивць дріжджів датується 1963 роком, коли Беван і Маковер описав секрецію молекул певним ізолятом пивних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що пригнічує ріст інших штамів дріжджів. Пізніше секретована молекула була ідентифікована як білок який був названий фактором-кілером або токсином-кілером, а штам що продукує їх — дріжджами-кілерами. До сьогодні токсинів-кілерів було виявлено понад 100 аскоміцетних і понад 50 базидіоміцетних видах дріжджів. Деякі з цих токсинів були широко вивчені. зосереджуючись на структурі та механізмах знищення клітин або на дослідженні їх прикладних аспектів [7].

Дріжджі роду *Torulaspora delbrueckii* виділяють білкові токсини-вбивці, смертельні для чутливих штамів дріжджів. Кілер токсин який продукує даний мікроорганізм не є чутливим до власного токсину [3].

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Гафійчук А.Р.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Красінько В.О.					10	4
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Кожні дріжджі-кілери мають імунітет до свого власного токсину або до токсинів, що виробляються штамами того самого типу-кілера [10].

Штам *Torulasporea delbrueckii* NRCC 1033 (виробник токсину-кілера) демонструє значний інгібуючий ефект на ріст різних досліджуваних дріжджів. У даного токсин молекулярна маса становить близько 30 кДа, Кілерна активність зазвичай є стабільною між рН 4,2 та 4,8 і інактивувалася при температурах які становлять вище 40 °С.

Токсин має глюканазну і хітиназну активність, також він стабільний в умовах виноробства. Передбачуваний спосіб дії кілер-токсину включає в себе зв'язування з β 1-6 глюканом і хітином. Під час початкової взаємодії токсину з чутливими клітинами з потенційною деградацією цих полісахаридів (через їхню β -глюканазну та хітиназну активність), відбувається руйнування клітинної стінки (хітин зниження оцінки під мікроскопом) і, нарешті, загибель клітин шляхом некрозу в початковий час і апоптозу через 24 години [3].

Токсини-кіллери можна використати для боротьби з дріжджами-паразитами в харчовій промисловості. Тому вони мають потенціал як природні протимікробні засоби в харчових продуктах та для біологічного контролю рослинних патогенів. Але найбільшу увагу приділяють саме у виноробній промисловості оскільки використовуються для контролю над дріжджовими популяціями під час бродіння, а також , запобігають росту шкідливих мікроорганізмів, які викликають винні хвороби та сприяють псуванню вина. Крім того, кіллер токсини допомагають контролювати ферментаційний процес, регулюючи рівень дріжджового росту та перешкоджаючи появі небажаних ароматів та смаків у вині. Це особливо важливо в умовах, коли зберігання вина триває тривалий період, оскільки кіллер токсини допомагають зберігати його якість протягом тривалого часу [2].

Виноробство є важливою складовою галуззю сільськогосподарського сектору, впливаючи на економіку та культуру країн світу. У сучасних умовах, виноробство стало об'єктом підвищеного інтересу. За останні роки, український ринок вина демонструє стійкий ріст. У свою чергу, стрімкий розвиток виноробства стимулює

впровадження нових технологій та інновацій, які включають: використання сучасних методів вирощування винограду, нові методи збереження продукції. Однією з таких перспективних технологій є використання кіллер-токсинів замість традиційним хімічним засобом, приклад продукту зображено на рис.1.1, які використовуються для пригнічення небажаної мікробіоти.



Рис.1.1 Дріжджі-вбивці, для використання для контрольованого бродіння, для вторинного бродіння а також для виробництва вин з високою масою суслу, без залишків цукру.

Лікарських засобів, повністю заснованих на кіллер-токсинах, поки що не існує, але досліджуються можливості їх практичного застосування у виноробстві [7], сільському господарстві, ветеринарії та харчовій промисловості. Але, переглядаючи препарати у світовому ринку, можна знайти препарати на основі дріжджів, в яких є наявний токсин-кіллер. Серед ось цих препаратів був *Saccharomyces cerevisiae* від виробника Lalvin та Bioferm-Killer (Рис.1.2).



Рис. 1.2. Дріжджі з кіллер-токсином: А) Lalvin: Б) Bioferm Killer{6, 71-1

Зазвичай товарна форма даних препаратів у вигляді гранул так у вигляді порошку коричневого кольору. Як правило виробник пакує дані дріжджі , масою від 2 г. до 10 г. також можливе пакування у 100 г або більше але на вимогу замовника. Висушенні винні дріжджі мають рН від 5.5 до 7.2 , та вологість меншу 5%. Термін придатності препаратів складає 12 місяців [8,9].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

На даний час здатність до продукування кілер-токсинів виявлена у багатьох видів дріжджів. Найбільш відомі види дріжджів, що виробляють кілер-токсин є – *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia acaciae* та *Kluuyveromyces lactis* [11]. Усі відомі токсини-кілери, що продукуються дріжджами-кілерами, є білками, які вбивають чутливі до них клітини. У свою чергу антибіотики - це біологічно активні речовини, які виробляються будь-яким мікроорганізмом і мають активність проти грибків, бактерій, вірусів і ракових клітин. На сьогоднішній день для дріжджів-вбивць та їх токсинів знайшли кілька застосувань. Наприклад, дріжджі-вбивці використовуються для боротьби з дикими дріжджами, що забруднюють їжу, і для боротьби з патогенними грибами у рослин. У галузі медицини ці дріжджі використовувалися для розробки нових антимікотичних засобів для лікування грибкових інфекцій людей та тварин. Крім того, дані дріжджі використовувалися для контролю забруднюючих дріжджів дикого типу у виноробстві, пивоварінні та інших галузях бродіння [7].

2.1 Коротка інформація про штами дріжджів

Штам *Torulasporea delbrueckii* (рис.2.1) використовують для продукування кілерних-токсинів також широко рекомендований для поліпшення деяких специфічних характеристик вин [12]. Дріжджі *T. delbrueckii* є прототрофними штамми, виділеними зі спонтанного бродіння винограду. Промислове використання цих дріжджів знаходиться під патентною заявкою (характеристика продуцента наведена в таблиці 2.1) [13].

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробник		Гафійчук А.Р.			Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Красінько В.О.				14	7
Н. контр					Кафедра БТМ		
Консульт							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					



Рис.2.1. *Torulaspora delbrueckii* при мікроскопіюванні.

Нещодавно було показано, що *Kluveromyces phaffii* DBV PG 6076, колишня назва *Tetrapisispora phaffii*, (Рис.2.2.) виробляє токсин-убивцю (KpKt), який діє на дріжджі, що псують вино. Токсин має широку активність проти *Hansenispora* / *Kloeckera* в умовах виноробства, отже, представляє особливий інтерес для його потенційного застосування як антимікробного агента у виноробній промисловості. Вчені виявили що даний токсин, має токсичну дію на людину та тварин тому його не варто використовувати як лікарський засіб, як наприклад токсин *Torulaspora delbrueckii* [14].



Рис.2.2. *Kluveromyces phaffii* при мікроскопіюванні.

Паномікоцин, токсин-убивця *Pichia anomala* NCYC 434 (K5) (Рис.2.3.), представлений мономерним глікопротеїном 49 кДа з екзо- β -1,3-глюканазною активністю [16]. Завдяки декількох дослідженнях токсину *Pichia anomala* повідомили, що штам (NCYC 434 (K5)) має широкий спектр міжродового знищення, і

тому його білок-вбивця вважається потенційним продуцентом протигрибкових лікарських засобів [15].

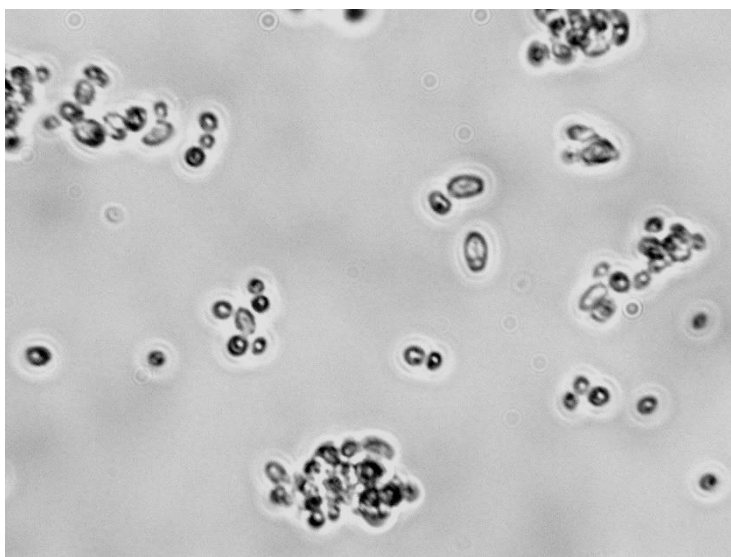


Рис. 2.3. *Pichia anomala* NCYC 434 (K5) при мікроскопіюванні.

Особливості одержання кілер-токсину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л		Концентрація продукту, мг/л	Молекулярна маса	Умови культивування	Джерело
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Компонент	Концентрація, г/л	27	45кДа	рН 4,4 при 30 С° 72 год	[13] Abu-Mejdad, N.M.J.A., Al-Badran, A.I. & Al-Saadoon, A.H. Purification and characterization of two killer toxins originated from <i>Torulaspora delbrueckii</i> (Lindner) and <i>Wickerhamomyces anomalus</i> (E.C.Hansen) Kurtzman, Robnett, and Basehoar-Powers. <i>Bull Natl Res Cent</i> (2020). 44, 48 https://doi.org/10.1186/s42269-020-00308-w
	дріжджовий екстракт:	3 г,				
	солодовий екстракт:	3 г,				
	пептон:	5 г,				
	глюкоза:	10 г.				
<i>Kluyveromyces phaffii</i> DBV PG 6076	Дріжджовий екстракт Васто:	10 г;	14,3	33 кДа	рН 4,5 при 6°С 40 год	[14] Francesca Comitini, Natalia Di Pietro, Laura Zacchi, Ilaria Mannazzu, Maurizio Ciani. <i>Kluyveromyces phaffii</i> killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. <i>Microbiology</i> . 2004, 8(150):2535-2541. https://doi.org/10.1099/mic.0.27145-0
	Пептон:	10г;				
	Глюкоза:	50г.				
<i>Pichia anomala</i> Клітини NCYC 434	Дріжджового екстракту :	1%	6,4	49 кДа	рН 5,5 при 20°С 48 год	[15] Izgu F, Altinbay D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo-beta-1,3-glucanase. <i>Biosci Biotechnol Biochem</i> . 2004, 68(3):685-93. doi: 10.1271/bbb.68.685
	Пептон :	2%				
	Декстроза :	2%				

2.2 Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів кілер-токсинів

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації *
1	2	3	4	5	6
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Дріжджовий екстракт:	3 г	1100	3,3	1
	Солодовий екстракт:	3 г	96	0,29	2
	Пептон:	5 г	224	1,12	3
	Глюкоза:	10 г	10	0,1	4
	Вартість 1 л середовища – 4,81 грн				
<i>Kluyveromyces phaffii</i> DBV PG 6076	Дріжджовий екстракт:	10 г	1100	11	1
	Пептон:	10г	224	2,24	3
	Глюкоза:	50г	10	0,5	4
	Вартість 1 л середовища – 13,74 грн				
<i>Pichia anomala</i> Клітини NCYC 434	Дріжджовий екстракт :	10	1100	11	1
	Пептон :	20	224	4,48	3
	Декстроза :	20	55	1,1	5
	Вартість 1 л середовища – 16,58 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на травень 2023 р.

- 1) <https://kreon-d.com.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 2) https://prom.ua/ua/p1651632471-solodovyj-ekstrakt.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_war_produkty_pitaniya&gclid=CjwKCAjwvJyjBhApEiwAWz2nLaW5Tb9DS6XDhWXnuhPuqEfFMJV8kMYco6fB1k-nMDPhZP6dwqirdBoCPl8QAvD_BwE
- 3) <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>
- 4) <https://flagma.ua/pishchevaya-glyukoza-o12672296.html>
- 5) https://gurman-vn.biz/p976560191-agar-agar-1200.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=19847412414&utm_content=&utm_term=&utm_position=&utm_device=c&utm_placement=&utm_target=&gclid=CjwKCAjwvJyjBhApEiwAWz2nLQ04I6tPXL10CJyVo3iow5P05s8tGTjIyroi5v2hgd-NRX1uJvGB5xoCV2wQAvD_BwE

Умовна вартість 1 г кілер-токсину

Продуцент	Концентрація, г/л	Тривалість Культивування, год	Кількість утворених кілер – токсину за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	27	72	0,38	4,81	0,18
<i>Kluyveromyces phaffii</i> DBV PG 6076	14,3	40	0,36	13,74	0,96
<i>Pichia anomala</i> Клітини NCYC 434	6,4	48	0,13	16,58	2,59

Таким чином, на основі аналізу даних, наведених у табл. 2.2 і 2.3, можна з впевненістю сказати, що *Torulaspora delbrueckii* є найкращим серед наведених штамів тому, та має найнижчу вартість токсину та одні з найкращих показників синтезу, що дозволяє обрати даний мікроорганізм для подальших досліджень в курсовій роботі.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Torulaspora delbrueckii*

Клітини *Torulaspora delbrueckii* здебільшого мають кулясту форму (інша назва - торула), хоча іноді можуть бути еліпсоїдними або яйцеподібними (Рис. 2.4).

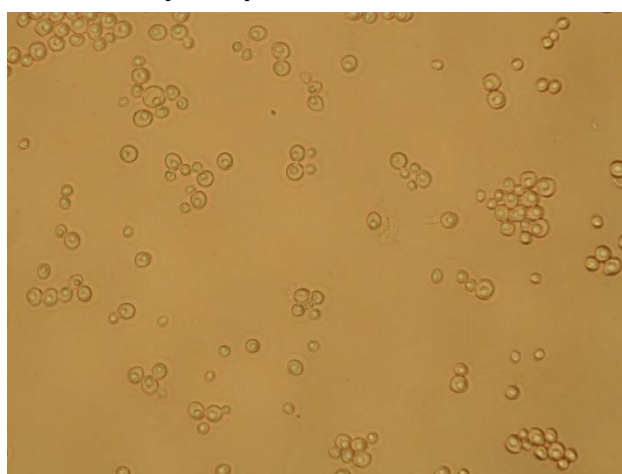


Рис. 2.4. *Torulaspora delbrueckii* при мікроскопіюванні [20].

Їх розміри становлять 2-6 × 3-7 мкм. *Torulaspora* рідко утворює псевдогіфи і ніколи не утворює справжніх гіф. Раніше вважалося, що *Torulaspora delbrueckii* є

гаплоїдними дріжджами через їх невеликий розмір клітин і відсутність або рідкісну наявність тетрад у середовищі спороношення. Проте, нещодавні дослідження припускають, що *T. delbrueckii* може бути переважно диплоїдними та гомоталічними дріжджами. Невеликий розмір клітин *Torulaspota* можна пояснити тим, що вони мають лише 16 хромосом на диплоїдній стадії, на відміну від 32 хромосом, що є у диплоїдних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [17].

Torulaspota delbrueckii вирощують при 24°C у середовищі на основі YPD (дріжджовий екстракт пептон-декстроза), яке містить 1% дріжджового екстракту (г/л), 1% Васто репtone (тваринний ферментативний перевар білків великої рогатої худоби та свиней) (г/л) і 6% глюкози (г/л), з додаванням або без додавання 2% агару (г/л).

Здатність до споруляції перевіряли за допомогою мікроскопії через 3 дні при 24°C на ацетатному середовищі (1% ацетат калію, 2% агар). *T. delbrueckii* зазвичай утворюють аски з однією унікальною аскоспорою, тоді як аски з двома-чотирма спорами зустрічаються рідше [18].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента.

За сучасна філогенетичною класифікацією *Torulaspota delbrueckii* належить до:

Домен – *Eukaryota*;

Відділ – *Saccharomycotina*;

Клас – *Saccharomycetes*;

Порядок – *Saccharomycetales*;

Родина – *Saccharomycetaceae*;

Рід – *Torulaspota*;

Вид – *delbrueckii* [19].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба в цільовому продукті – кіллер-токсин

Кіллер-токсини - це білкові речовини, які клітина дріжджів виділяють для того, щоб завдавати шкоди конкуруючим дріжджам. Штами дріжджів, які виробляють кіллер-токсини, можуть виробляти один або декілька типів токсинів, спектр дії яких спрямований на знищення патогенних мікроорганізмів. Таким чином, вони мають потенціал як природні протимікробні засоби в харчових продуктах і для біологічного контролю рослинних патогенів, а також як терапевтичні засоби проти інфекцій тварин і людини. Але особливу увагу приділяють саме у виноробній промисловості. Оскільки використовуються у виноробстві для контролю над дріжджовими популяціями під час процесу бродіння [21].

Актуальність використання кіллер-токсинів у виноробстві полягає в: забезпечення якості вина, контролю солодкості та аромату, запобіганні винним хворобам, збільшенні стабільності виробництва, ефективності та економії часу та ресурсів. Кіллер-токсини допомагають контролювати дріжджові популяції та мікроорганізми під час бродіння, запобігаючи росту шкідливих мікроорганізмів, які можуть викликати винні хвороби та спричинити псування вина. Вони допомагають забезпечити стабільний виробничий процес виноробства, зменшуючи ризик непередбачених інцидентів та втрати продукції [22].

Виноробство є важливою складовою галуззю сільськогосподарського сектору, впливаючи на економіку та культуру країн світу. У сучасних умовах, виноробство стає об'єктом підвищеного інтересу.

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Гафійчук А.Р.</i>						21	8
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>					Кафедра БТМ		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

За останні роки, світовий ринок вина демонструє стійкий ріст. Згідно з прогнозами на 2023 рік, його обсяг оцінюється в 333 мільярди доларів США, а річний темп зростання складає 5,2%.

У 2022 році ринок вина сягнув 302 мільярди, проте передбачається, що до 2028 року ця цифра зросте до 423,59 мільярдів доларів США. У свою чергу, динамічний розвиток виноробної галузі стимулює впровадження нових технологій та інновацій, що включають в себе використання сучасних методів вирощування винограду, нові технології виробництва та методи збереження продукції. Однією з таких перспективних технологій є використання кілер-токсинів замість традиційних хімічних засобів які використовують для пригнічення небажаної мікробіоти.

Отже, використання кілер-токсинів у виноробстві залишається актуальним завдяки їхньому потенціалу покращити якість вина, забезпечити захист від захворювань та відповідати сучасним екологічним стандартам. За таких умов, виноробна промисловість стає однією з ключових складових сільськогосподарського сектору, впливаючи на глобальну економіку [23].

3.2 Розрахунок теоретично можливого рівня біомаси.

Оскільки у наявній науково-технічній літературі відсутні дані стосовно накопичення біомаси дріжджів – продуцентів кілер-токсинів, для подальших розрахунків потужності виробництва нам необхідно розрахувати біомасу дріжджів.

У поживному середовищі джерелами азоту виступає пептон та дріжджовий екстракт. Вміст азоту в біомасі становить 10-14 % від сухої маси речовин. Щоб визначити рівень біомаси, якого можна досягти під час вирощування грибів на середовищі з 5 г/л сечовини та 3 г/л дріжджового екстракту, треба спочатку розрахувати, яку кількість амінного азоту містять ці речовини.

Кількість амінного азоту в пептоні може варіюватися залежно від джерела і методів його виробництва. Зазвичай пептони містять близько 13% амінного азоту.

Таким чином, вміст амінного азоту у 5 г пептону дорівнює $(5 \cdot 13) / 100 = 0,65$ г Нітрогену.

Дріжджовий екстракт також є джерелом азоту. Таким органічним Нітрогеном є аміний Нітроген і частково білковий. Концентрація доступного для дріжджів органічного Нітрогену (за елементом N) у дріжджовому екстракті становить 8 % від загального вмісту сухої речовини в екстракті. У свою чергу дріжджові екстракти містять близько 40% сухої речовини, яка включає білки та інші органічні сполуки [8].

Для початку розрахуємо кількість сухої речовини у дріжджовому екстракті, що становить $(3 \cdot 40) / 100 = 1,2$ г. Тоді кількість органічного Нітрогену становить $(1,2 \cdot 8) / 100 = 0,1$ г.

Загальний вміст Нітрогену становить $0,65 + 0,1 = 0,75$ г. Розрахуємо, яку кількість біомаси можливо отримати, якщо вміст азоту – 10 %, тоді $(0,75 / 0,1) = 7,5$ г/л.

Отже, з 0,75 г азоту можна одержати 7,5 г/л біомаси, що і приймаємо для подальших розрахунків.

3.3. Розрахунок потужності виробництва.

Споживачі все більше цінують екологічно вироблені продукти, включаючи вино. Глобальне надлишок вина призводить до зосередження уваги на зниженні витрат для досягнення конкурентних переваг екологічно сертифікованих вин. Використання кілер-токсинів для контролю за хворобами може допомогти виробникам вина впроваджувати економічно вигідні та екологічно чисті методи виробництва, й задовільнити потреби споживачів.

На сьогоднішній день в Україні достатньо мало виробників, які виробляють екологічно чисте вино, одне з яких це ТОВ «Серцевина», що була обрана нами. На своїй виноробні «ASKANO VALLEY» у якій виробляється лімітована серія преміальних витриманих крафтових вин. Виноробня має власні виноградники, що розташовані в екологічно чистій зоні. Проводиться ручний збір, сортування та

унікальна технологія первинного виноробства з витримкою у бочці з французького дубу не менше шести місяців.

Ми вирішили постачати винні дріжджі іншим виробникам вина які тісно співпрацюють з обраним підприємством, це має стратегічне значення в контексті збільшення обсягів виробництва винних дріжджів та розвитку цієї галузі. А також для організації на їх базі виробництва і постачання винних дріжджів, здатних продукувати кілер-токсин. Підприємства виробляють до 180 000 пляшок по 0,75 л на рік, що становить 135 000 л вина на рік. Згідно літературних джерел з одного літра сусла виходить 0,75 л готового вина. Розрахуємо загальний необхідний об'єм сусла:

$$135\ 000 / 0,75 = 180\ 000 \text{ л сусла}$$

За знайденою інформацією [9] на 1 л сусла потрібно додати 0,4 г дріжджів. З цього потрібно розрахувати необхідну кількість дріжджів на 180 000 л сусла:

$$180\ 000 \cdot 0,4 = 72\ 000 \text{ г дріжджів}$$

З одного літру культуральної рідини ми отримуємо 7,5 г/л (кг/м³) дріжджів. Отже, розрахуємо необхідну кількість культуральної рідини для отримання 72 000 г дріжджів:

$$7,5 \text{ кг} = 1 \text{ м}^3 \qquad X = 9,6 \text{ м}^3$$

$$72 \text{ кг} = X \text{ м}^3$$

З урахуванням втрат цільового продукту при виділенні (15%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 9,6 \cdot 1,15 = 11 \text{ м}^3$$

3.4. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення річної потреби у кілерних дріжджах (згідно п. 3.3) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 11 м³ культуральної рідини. Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість трудоднів – 117, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{гп} / T_{тр} = 4,5 / 117 = 0,115 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 * V_d * T_{цф}) / 24 = (1,3 * 0,115 * 81) / 24 = 0,5 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (72 год) та час підготовки ферментера до роботи (9 год).

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість циклів становить:

$$N_{цк} = V_{кр} / V_{цк} = 13,5 / 0,5 = 27 \text{ циклів.}$$

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{г} = V_{цк} / K_3 = 0,5 / 0,6 = 0,83 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{ф} = 1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 0,5 / 1 = 0,5 - \text{ не перевищує задане значення.}$$

1.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу дріжджів

За один виробничий цикл отримують $0,5 \text{ м}^3$ культуральної рідини (див. п.1.4). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які становлять від 10 - 15%.

Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{\text{РОБ.1}} = V_{\text{КР}} \times (1 + E_{\text{Ф}}) = 0,5 \times 1,1 = 0,55 \text{ м}^3$$

де $E_{\text{Ф}}$ - втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює $0,55 \text{ м}^3$. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{Ф}} = 0,55 / 0,6 = 0,92 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{СТ1}} = 1 \text{ м}^3$. Після чого уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{3,1} = 0,55 / 1 = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення та перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,5-0,65), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{\text{РОБ.1}} = 0,55 \text{ м}^3$ середовища необхідно приготувати:

$$V_{\text{ПМ1}} = V_{\text{РОБ.1}} \times X_{\text{Ф}} = 0,55 \times 0,1 = 0,055 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу,}$$

де $X_{\text{Ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{ПС1}} = V_{\text{РОБ.1}} - V_{\text{ПМ1}} = 0,55 - 0,055 = 0,495 \approx 0,5 \text{ м}^3$$

Врахуємо, що під час одержання $0,055 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{РОБ.2}} = V_{\text{ПМ1}} \times (1 + E_{\text{Ф}}) = 0,055 \times 1,1 = 0,06 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $0,06 \text{ м}^3$ за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{ПА2}} = 0,06 / 0,6 = 0,1 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{СТ2}} = 0,1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{32} = 0,06 / 0,1 = 0,6$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення та перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,5-0,65), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{\text{РОБ.2}} = 0,06 \text{ м}^3$ необхідно приготувати:

$$V_{\text{ПМ2}} = V_{\text{РОБ.2}} \times X_{\text{Ф}} = 0,06 \times 0,1 = 0,006 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу,}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{ПС2}} = V_{\text{РОБ.2}} - V_{\text{ПМ2}} = 0,06 - 0,006 = 0,054 \text{ м}^3$$

Врахуємо, що під час одержання $0,006 \text{ м}^3$ (6 л) посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{РОБ.3}} = V_{\text{ПМ2}} \times (1 + E_{\text{Ф}}) = 0,006 \times 1,1 \approx 0,0066 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $0,0066 \text{ м}^3$ (6,6 л) за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{ПА3}} = 0,0066 / 0,6 = 0,011 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{СТ2}} = 0,01 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{33} = 0,0066 / 0,01 = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває приблизно у встановлених межах для аеробних процесів (0,5-0,65), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати

$$V_{\text{ПМ3}} = V_{\text{РОБ.3}} \times X_{\text{ін}} = 6,6 \times 0,1 = 0,66 \text{ л}$$

де $X_{in} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{ПСЗ} = V_{РОБ.З} - V_{ПМЗ} = 6,6 - 0,66 = 5,94 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{ПМЗ} = 0,66$ л (660 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{КОЛЬ} = 0,75$ л з коефіцієнтом заповнення $K_{ЗК} = 0,2$.

Тоді кількість колб становить:

$$N_{КОЛЬ} = V_{ПМЗ} / (V_{КОЛЬ} \times K_{ЗК}) = 0,66 / (0,75 * 0,2) = 5 \text{ колб}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу необхідної кількості біомаси дріжджів *Torulasporea delbrueckii* необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 1 м^3 , інокулятори об'ємом $0,1 \text{ м}^3$ та $0,01 \text{ м}^3$, а також 5 качалочних колб.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Torulaspora delbrueckii*

Джерелом карбону та енергії при вирощуванні *Torulaspora delbrueckii* є глюкоза [13]. Опираючись на статтю та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози катаболізм цукрів – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, наводимо схему перетворення глюкози (рис 4.1).

Глюкоза за участю глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.69) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктози 6-фосфат у β -D-фруктозу 1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозу 1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат. До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробник		Гафійчук А.Р.			Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Красінько В.О.				29	8
Н. контр					Кафедра БТМ		
Консульт							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ							

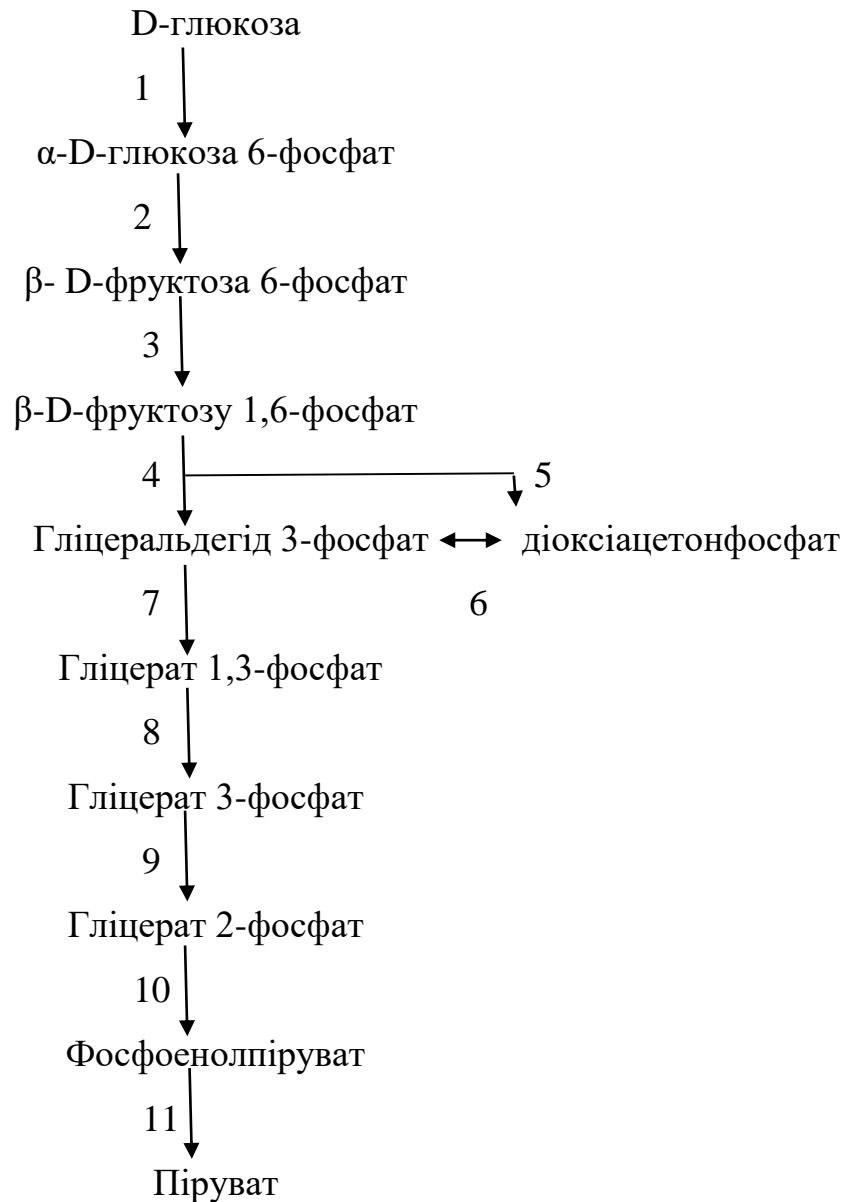


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Меейргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.69); 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – фосфоглюкокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 6 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Torulaspora delbrueckii* з використанням глюкози як джерела вуглецю, в наслідок катаболізму вуглеводів, утворюється ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Дріжджові кіллер-токсини – це білкові токсини, які часто глікозильовані та зв'язуються зі специфічними рецепторами на поверхні мікроорганізму-мішені. Вони виробляються певними штамами дріжджів і вбивають інших мікроорганізмів, що не мають здатності виробляти ці токсини. Гени, що кодують токсин-кіллер, можуть бути локалізовані або в ядрі, або на цитоплазматичних дволанцюгових молекулах ДНК або РНК вірусного походження. Дріжджові кіллер-токсини складаються з двох компонентів: α -пептиду і β -пептиду. Альфа-пептид забезпечує специфічну активність токсину, тоді як бета-пептид допомагає транспортувати альфа-пептид до клітин, що мають бути вбиті. Базуючись на розглянутій інформації кіллер-токсини це білки, до складу яких входять 20 амінокислот [3].

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Амінокислоти піруватної родини (серин, гліцин, цистин) утворюються з фосфогліцерату та (аланін, валін, лейцин) утворюються з пірувату.

Амінокислоти ароматичної родини (гістидин, фенілаланін, тирозин, триптофан) утворюються із еритрозо-4-фосфат. Надалі у схемі біосинтезу ми детально розглянемо саме цю родину ароматичних амінокислот.

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК при рості на глюкозі є реакції: карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату (під дією фермента фосфоенолпіруваткарбоксилази (КФ 4.1.1.31)), карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату (ферментом піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1)) та

карбоксілювання пірувату з утворенням малату (ферментом малатдегідрогеназа декарбоксілювальна (КФ (1.1.1.40))).

Глюконеогенез відсутній оскільки ріст дріжджів відбувається на вуглеводному субстраті.

3-Фосфогліцерат є попередником серину, гліцину і цистеїну. Піруват – попередник аланіну, валіну і лейцину. Піруват утворюється з фосфоенолпірувату за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану.

Надалі еритрозо-4-фосфат за участю дезокси-7-фосфогептулонатсинтази (КФ 2.5.1.54), пентафункціонального поліпептиду AROM (КФ 4.2.3.4) та хоризматсинтази (КФ 4.2.3.5) перетворюється на хоризмат з якого за допомогою хорізмар мутази (КФ 5.4.99.5) утворюється префенат, що є попередником L-тирозину та L-фенілаланіну. Так під дією рефенатдегідратази (КФ 4.2.1.51) префенат перетворюється на фенілпіруват, який за допомогою ферменту гістидинопірофосфатаміотрансферази (КФ 2.6.1.9) перетворюється на **L-фенілаланін**. Також префенат перетворюється на 3-(4-гідроксифеніл)піруват під дією префенатдегідрогенази (NADP⁺) (КФ 1.3.1.13) після того аміотрансфераза ароматичних амінокислот II (КФ 2.6.1.58) перетворює отриману сполуку на **L-тирозин**.

Утворений раніше харизмат під дією компонента I антранілатсинтази (КФ 4.1.3.27), антранілатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.18), фосфорибозилантранілатізомерази (КФ 5.3.1.24), індол-3-гліцеролфосфатсинтази (КФ 4.1.3.27) та триптофансинтази (КФ 4.2.1.20) перетворюється на **L-триптофан**.

Остання амінокислота ароматичної родини - L-гістидин утворюється із попередника L-гістидіналу. L-гістидінал утворюється з D-рибоза-5-фосфат під дією ферментів: рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1), АТФ-

фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17), гістидиолдегідрогеназа (КФ 3.6.1.31), гістидиолдегідрогеназа (КФ 3.6.1.31), фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазол карбоксамід риботид ізомераза (КФ 5.3.1.16), імідазолгліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.3.2.10), імідазолегліцерин-фосфатдегідратаза (КФ 4.2.1.19), істидиол-фосфатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.9), гістидиол-фосфатаза (сімейство РНР) (КФ 3.1.3.15) та гістидиолдегідрогеназа (КФ 3.6.1.31). Після чого L-гістидінал за допомогою фермента гістидиолдегідрогенази (КФ 3.6.1.31) перетворюється на **L-гістидин**.

Далі усі 20 синтезованих амінокислот під дією універсального ферменту Аміноацил-тРНК синтетази (КФ 6.1.1.) перетворюються на **Пре-протеїн** який в свою чергу завдяки ферменту АДФ-рибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.31.) перетворюється на **Кілер-токсин**

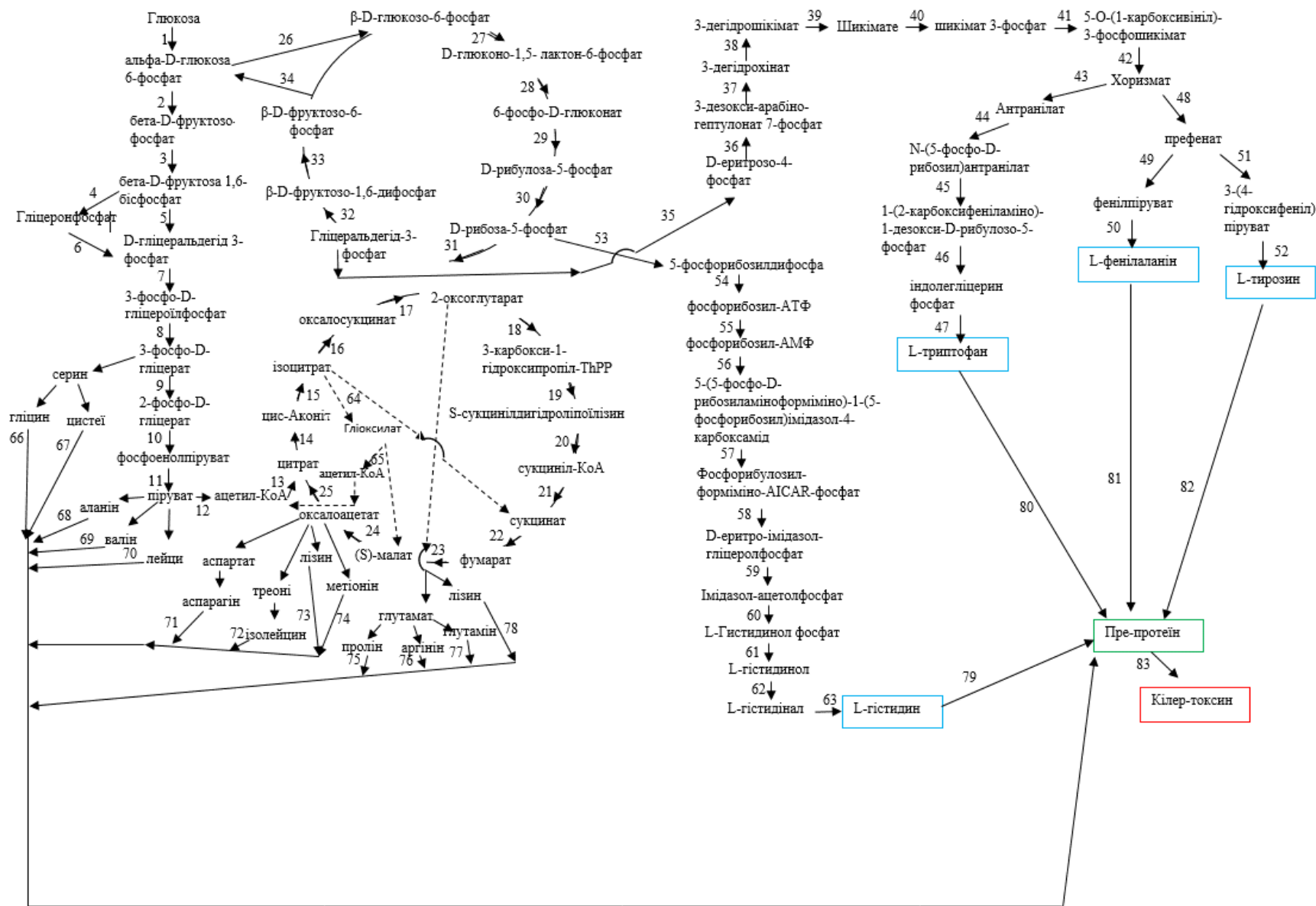

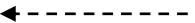


Рис. 4.2 Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт

Умовні позначенн: 1)  основний шлях біосинтезу; 2)  анаплеротичні реакції.

Ферменти: 1 – глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.69); 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – фосфоглюкокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 6 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 12 – піруват-дегідрогеназа (КФ 1.2.7.1); 13 – цитрат АТФ (про-S)-ліаза (КФ 2.3.3.8); 14 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 15 – ізоцитратдегідрогеназа (НАД⁺) (КФ 1.1.1.41); 16 – компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.2); 17 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 18 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 19 – компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.2); 20 – компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.2); 21 – компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E2 (КФ 2.3.1.61); 22 – альфа-субодиниця сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.4); 23 – сукцинатдегідрогеназа (убіхінон) залізо-сірчана субодиниця (КФ 1.3.5.1); 24 – фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 25 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 26 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 27 – глюкозо-6-фосфат 1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.48); 28 – 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31); 29 – 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44); 30 – рибоза - 5-фосфатізомераза B (КФ 5.3.1.6); 31 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 32 – фруктозо-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 33 – трансальдолаза (КФ 2.2.1.2); 34 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 35 – транскетолаза (КФ: 2.2.1.1); 36 – -дезоксигептулатсинтаза (КФ 2.5.1.54); 37 – пентафункціональний поліпептид AROM (КФ 4.2.3.4); 38 – пентафункціональний поліпептид AROM (КФ 4.2.3.4); 39 – пентафункціональний поліпептид AROM (КФ 4.2.3.4); 40 – пентафункціональний поліпептид AROM (КФ 4.2.3.4); 41 – пентафункціональний поліпептид AROM (КФ 4.2.3.4); 42 – хоризматсинтаза (КФ 4.2.3.5); 43 – компонент I антранілатсинтази (КФ 4.1.3.27); 44 – антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18); 45 – фосфорибозилантранілатізомераза (КФ 5.3.1.24); 46 – індол-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.1.3.27); 47 – триптофансинтаза (КФ 4.2.1.20); 48 – хоризмар мутаза (КФ 5.4.99.5); 49 – рефенатдегідратаза (КФ 4.2.1.51); 50 – гістидином-фосфатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.9); 51 – префенатдегідрогеназа (NADP⁺) (КФ 1.3.1.13); 52 – амінотрансфераза ароматичних амінокислот II (КФ 2.6.1.58); 53 – рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 54 – АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17); 55 – гістидиномдегідрогеназа (КФ 3.6.1.31); 56 – гістидиномдегідрогеназа (КФ 3.6.1.31); 57 – фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазол карбоксамід риботид ізомераза (КФ 5.3.1.16); 58 – мідазолгліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.3.2.10); 59 – імідазолегліцерин-фосфатдегідратаза (КФ 4.2.1.19); 60 – істидином-фосфатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.9); 61 – гістидином-фосфатаза (сімейство PNP) (КФ 3.1.3.15); 62 – гістидиномдегідрогеназа (КФ 3.6.1.31); 63 – гістидиномдегідрогеназа (КФ 3.6.1.31); 64 – ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1); 65 –

малатсинтетаза (КФ 2.3.3.9). 66 - гліцил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.14); 67 - цистеїніл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.16); 68 - аланіл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.7); 69 - валіл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.9); 70 - лейцил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.4); 71 - аспарагініл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.22); 72 - ізолейцил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.5); 73 - лізил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.6); 74 - метіоніл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.10); 75 - проліл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.15); 76 - аргініл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.19); 77 - глютамініл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.18); 78 - лізил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.6); 79 - гістидил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.21); 80 - триптофаніл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.2); 81 - фенілаланіл-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.20); 82 - тирозил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.1); 83 - АДФ-рибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.31)1.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Вибір умов і способу культивування *Torulaspora delbrueckii*

Для вірного вибору умов та способу культивування потрібно спиратися на фізіолого-біохімічні характеристики даного біологічного агента. Існує два основних типи культивування: глибинне та поверхнєве.

При вирощуванні на поверхні живильного середовища мікроорганізми отримують кисень з повітря. При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу контакту між середовищем і повітрям. У лабораторіях це роблять у чашці Петрі, оскільки вона має широке та пласке дно, на яке можна нанести тонкий шар середовища. В промисловості для цього використовують кювети.

Глибинне культивування відбувається у рідкому середовищі. Під час цього процесу мікроорганізми використовують кисень, розчинений у воді. Оскільки розчинність кисню у воді є недостатньою, до рідкого середовища потрібно додавати повітря штучно, щоб дозволити аеробам рости в товщі рідини. Найпростішим методом є струшування колби або пробірки спеціальним валиком, що збільшує площу контакту середовища з киснем. У промислових умовах, коли мікроорганізми вирощуються у ферментаторах, кисень подають у середовище одночасно з механічним перемішуванням [24].

Згідно зі статтею, оптимальні умови для культивування цього продуцента складають: температура близько 30°C, рН = 4,4 та наявність аераційного повітря. За таких умов можуть розвиватися різні сторонні мікроорганізми, тому для запобігання їх появі необхідно підтримувати асептичні умови культивування. Це досягається стерилізацією аераційного повітря, обладнання, комунікацій та поживного середовища [25].

У зв'язку з вищесказаним, культивування *Torulaspora delbrueckii* для синтезу

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник		Гафійчук А.Р.						
Керівник		Красінько В.О.					37	17
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

кіллер-токсину здійснюють глибинним способом. Цей спосіб забезпечить відповідні умови, за яких мікроорганізм буде розвиватися у товщі поживного середовища, через яке постійно проходить стерильне повітря, а середовище перемішуватиметься [26]. Також потрібно зазначити, що глибинний спосіб культивування полегшить подальше виділення і очищення кілер-токсинів.

Продуктування токсинів здійснюється під час періодичного культивування, оскільки синтез токсинів відбувається у стаціонарній фазі, а за підтримання мікроорганізму в еспоненційній фазі, що характерне для безперервного культивування, не буде відбуватись біосинтез кінцевого продукту. Також на відміну від безперервного процесу під час періодичного не можливе вимивання ще неспожитого субстрату з ферментера [27].

5.2. Вибір типу ферментера для культивування *Torulaspora delbrueckii*

Залежно від умов культивування біологічного агента ферментер може відрізнятися. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями мікроорганізма, необхідно обрати потрібне оснащення для ферментера, що задовольнить необхідні умови для синтезу кілер-токсинів.

1. Культивування продуцента *Torulaspora delbrueckii* відбувається в аеробних умовах, тому для підтримання життєздатності клітин необхідно проводити аерацію. У зв'язку з даною вимогою варто використовувати ферментер, який оснащений барботером, що забезпечить культуру необхідною кількістю кисню.

2. Біосинтез токсинів відбувається за $pH = 4,4$, через це ферментер повинен включати в себе датчик для контролю значень pH .

3. Процесі ферментації відбувається за сталою температурою, що становить $30^{\circ}C$, тому для підтримання даного значення при культивуванні, ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

4. Для забезпечення якісного перемішування потрібно використовувати мішалку. Оскільки культура не є чутливою до зрізових навантажень, тому що не утворює міцелій, оптимальним варіантом буде використання відкритої турбінної мішалки, яку для більшого ефекту варто розмістити над барботером, яка зможе підтримувати рівень кисню в межах 80% для нормальної життєздатності клітин

Torulaspora delbrueckii, це забезпечить зростання поверхні контакту фаз і коефіцієнту масопередачі та високий рівень диспергування повітря [27].

5. Проаналізувавши поживне середовище, необхідно зазначити, що завдяки вмісту дріжджового та солодового екстрактів при перемішуванні та аерації буде утворюватися піна, для цього у ферментері потрібно встановити механічні пристрої для піногасіння.

Зважаючи на те, що на вітчизняному ринку з виробництва промислових біореакторів не виготовляють ферментери об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 та оснащені турбінною мішалкою відкритого типу, тому ферментер виготовляється на замовлення. З замовленням щодо виробництва ферментера з заданими параметрами можна звернутися до фірми «Sartorius» (Німеччина) [28]. Компанія пропонує широкий перелік сервісних послуг, такий як розробка технічних рішень, проектування, постачання і монтаж устаткування для технологічного процесу.

Отже, для проведення виробничого біосинтезу кілер-токсинів необхідно замовити виробництво ферментера необхідним об'ємом (1 м^3), передбачити наявність барботеру, сорочки, відповідного типу мішалки, а також датчиками контролю рН та температури.

5.3 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.

Культивування продуцента *Torulaspora delbrueckii* відбувається в аеробних умовах, тому для підтримання життєздатності клітин необхідна аерація [29]. У зв'язку з цим варто використовувати ферментер, оснащений барботером, що забезпечить культуру необхідною кількістю кисню. Через що, нашою задачею є одержання великої кількості стерильного повітря для аерації.

Для підготовки посівного матеріалу та інокуляту використовують лабораторні приміщення та мікробіологічні бокси. Щоб забезпечити стерильність у цих приміщеннях, використовують ультрафіолетове опромінення (УФ-лампи).

Для підготовки стерильного аераційного повітря використовується метод механічного відокремлення часточок та мікроорганізмів. Принципом цього методу є фільтрування через пористі, стерилізуючі матеріали. Спосіб отримання стерильного аераційного повітря включає в себе наступні етапи:

1. Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту, на висоті 2 - 3 м від найвищої точки будівлі, оскільки із збільшенням висоти над поверхнею концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується, тобто для проєктованого виробництва - на висоті приблизно 10 м (висота ферментера – 1,6 м, висота поверху 6 м, косий дах будівлі – 1,5 м);

2. Для очищення повітря від грубого аерозолю, пилу та зменшення кількості контамінантів у ньому застосовують фільтри попереднього очищення. Ці фільтри можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як металеві стружки, кільця Рашига або губчастого пінополіуретану, змоченого оливою. Вони призначені для запобігання забрудненню компресорів та забезпечення ефективного очищення повітря від шкідливих часток. Ідеальним вибором для цього є фільтри з губчастого пінополіуретану, оскільки вони мають високу ефективність уловлювання пилу (50-85%) та відповідають вимогам щодо пилоємності і робочої температури (0,2 кг/м та 121 °С відповідно) [30].

3. Для подолання опору фільтраційних матеріалів на наступних етапах фільтрування та для подолання гідравлічного опору під час розподілу повітря у культурній рідині, застосовується підвищення тиску повітря. Це досягається шляхом його стиснення у турбокомпресорі до значення 0,35–0,5 МПа. Процес стиснення повітря у компресорі веде до збільшення температури до 120–250°C та підвищення вологості на одиницю об'єму.

4. Для охолодження нагрітого під час стиснення повітря та видалення вологи у краплевловлювачі, повітря охолоджують за допомогою водяного теплообмінного апарату;

5. Для остаточного видалення конденсованої вологи та вирівнювання тиску повітря подають у ресивер;

6. Для очищення повітря, що подається до усіх ферментерів цеху і видалення до 98% мікроорганізмів очищення проводять на головних фільтрах, які заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. Основною перевагою фільтруючого матеріалу є використання базальтових волокон, які володіють високою стійкістю до

впливу пару, мають стійкість навіть у порівнянні зі скляними волокнами та залишають свою міцність після довготривалого впливу гарячої пари та тиску.

7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах, повітря надходить через колектори від головних фільтрів (встановлені безпосередньо на кожному ферментері, затримують 99,999% мікроорганізмів).

Технологічно й економічно виправданим у промисловості є спосіб очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів, тому що вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999%. Фільтруючі матеріали, які використовуються на етапі тонкого очищення, розділяються на декілька груп: тонковолокнисті матеріали у вигляді матів, картону, паперу, зернисті тверді фільтруючі бар'єри (керамічні, металокерамічні, з полімерних матеріалів) та мембранні фільтри. В промислових фільтрах для тонкого очищення повітря найчастіше використовуються тонковолокнисті фільтруючі матеріали [30].

У сучасній практиці частіше використовують базальтове тонке та супертонке волокно, діаметр яких становить 0,7-1 мікромметр. Ці матеріали вважаються перспективними для мікробіологічної промисловості через їхню вартість, низький гідравлічний опір та велику здатність утримувати пил. Зважені в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному і дифузійному механізмам осадження.

При експлуатації фільтрів необхідна їхня стерилізація. Найбільш ефективним методом є нагрівання вологою парою і витримка протягом визначеного часу при температурі 125–130°C. Після стерилізації фільтруючий матеріал висушують гарячим повітрям [30].

5.4 Обґрунтування вибору мийних та дезинфікуючих засобів

Виробництво дріжджів *Torulasporea delbrueckii* здійснюється упродовж 117 днів і включає підготовку наступного обладнання: інокулятор – 10л, реактор - 10л, інокулятор - 100, реактор – 500л, ферментер - 1000, реактор – 10л, качалки, а також бокси та лабораторне устаткування.

Виробництво здійснюється в наступних приміщеннях: цех виробничого біосинтезу, лабораторне приміщення для проведення різноманітних операцій, де

знаходяться автоклави, бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю.

Слід зауважити, що для біотехнологічних виробництв, реалізованих з використанням ферментаційного обладнання великих обсягів (ферментер від 1 м³ і більше), варто орієнтуватися на будівельні норми, тому за ширину будівлі ми приймаємо найближче стандартне значення – 6 м. Довжину будівлі приймаємо кратну довжині стандартних будівельних плит, тобто 18 м.

Габаритні розміри основного обладнання наведено у *табл. 5.1*.

Таблиця 5.1.

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва дріжджів
*Torulaspora delbrueckii***

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	1000	0,9	1,6
Інокулятор I-8	10	0,3	0,71
Реактор Р-10	10	1,5	1,1
Інокулятор I-12	100	1,95	2,56
Реактор Р-14	500	1,15	2,2
Реактор Р-19	10	1,1	1,55
Всього	1630		

Згідно даним *табл. 5.1*, загальний об'єм реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 1,63 м³.

З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня, тобто 117 разів. Один раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (обробка стін, підлоги, вікон тощо), тобто 4 рази на 117 днів. Для розрахунку кількості мийних засобів необхідно розрахувати приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту. Висота найбільшого апарату складає 2,56 м, тому за висоту приміщення приймемо 4 м, враховуючи відстань від реактора до стелі в 1 м.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 72 м² (6×12 м), площа стін – [(12 × 4) + (6 × 4)] × 2 = 144 м², загальна площа миття – 72 + 144 = 216 м². Загальну площу поверхні обробки мийними засобами наведено у *табл. 5.2*.

**Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень дріжджів
*Torulaspora delbrueckii***

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	72	144	216
Мікробіологічна лабораторія	24	80	104
Приміщення з качалками	12	32	44
Загальна площа	108	256	364

Кількість виробничих циклів для виробництва дріжджів 27. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 28 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$1,630 \times 28 = 45,64 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 5.3*

**Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період
виробництва дріжджів *Torulaspora delbrueckii***

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	1,630	28	45,64
Підлога	108	117	12 636
Стіни, двері, вікна	256	4	1024

Для миття ємнісного обладнання використовується СІР-мийки. Витрати робочого розчину складають 20-30% від об'єму обладнання що миється, прийmemo витрати на середньому рівні у межах 20%. Отже, для миття та дезінфекції 45,64 м³ обладнання необхідно витратити:

$$45,64 \times 0,20 = 9,128 \text{ м}^3 \text{ засобу в рік}$$

Дані щодо вибору мийних та дезінфікуючих засобів доцільніше наводити у вигляді узагальнюючої таблиці 2.4. Під час вибору мийних та дезінфікуючих засобів необхідно зважати на їх ефективність і вартість, а також на витрати для обробки потрібної площі/об'єму. Зазвичай, для обробки 1 м² поверхні витрачається 100 мл розчину мийного або дезінфікуючого засобу.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва дріжджів *Torulaspora delbrueckii*

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
САНІФЕКТ [1]	Обладнання	0,3	59 300	10 494	415	1,25	13 118
«САНІМАКС» [2]	Поверхні приміщень та обладнання	0,2	59 300	10 494	1344	2,68	28 124
ДЕЗЕКОН [3]	Поверхні приміщень та обладнання	1,5	59 300	10 494	504	7,56	79 335
МАКСИСАН [4]	Поверхні приміщень та обладнання	0,25	59 300	10 494	1260	3,15	33 056
САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ-САНАЦІЯ [5]	Поверхні приміщень та обладнання	2	59 300	10 494	50	1	10 494

- <https://ukranalitika.com.ua/goods/dezinfitsiruyushchie-sredstva/dezinfitsiruyushchee-sredstvo-sanifekt-10/>
- <https://ukranalitika.com.ua/goods/dezinfitsiruyushchie-sredstva/dezinfitsiruschee-sredstvo-sanimaks-11/>
- <https://interdez.com.ua/ru/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>
- <https://interdez.com.ua/product/maksisan-unvcpd>
- <https://prom.ua/ua/p2166454711-universalnoe-moyuschee-sredstvo.html>

Враховуючи результати розрахунку у *Таблиці 5.4* серед усіх розглянутих мийних та дезінфікувальних засобів найкращим вибором для обробки обладнання є «САНІФЕКТ», а для поверхонь обладнання, обробки стін, вікон, дверей та підлоги – «САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ-САНАЦІЯ», оскільки вони мають низьку вартість за весь період виробництва (117 днів), що є одним з головних показників на виробництві, а також високою ефективністю при застосуванні.

Також потрібно пам'ятати, що для того, щоб не з'явилась стійкість мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів періодично необхідно проводити їх зміну згідно графіка чергування дезінфікуючих та миюче-дезінфікуючих засобів, зазвичай рекомендується чергувати кожні 1-3 місяці. Тому як заміна «САНІФЕКТ» для обробки обладнання можна використовувати «САНІМАКС», а для чергування засобу для поверхонь обладнання та приміщень можна використати «МАКСИСАН». Детальна інформація про обрані мийні та дезінфікувальні засоби зазначена нижче.

1) Назва засобу - САНІФЕКТ

Виробник – Україна

Склад засобу: Комплекс четвертинних амонієвих сполук (не менш 9,0%) в поєднанні з синергічно діючими активують добавками і допоміжними компонентами.

Форма випуску, призначення і фізико-хімічні властивості засобу.

«Саніфект» добре змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Водні розчини мають миючі та дезодоруючі властивості, легко змиваються з оброблених поверхонь, не залишають слідів, не фіксують органічні забруднення. Ефективність робочих розчинів при високій білкової навантаженні. Розчини видаляють білково-жирові забруднення, не чинять корозійної й іншої шкідливої дії на об'єкти, виготовлені з алюмінію, нержавіючої і низьковуглецевої сталі, покритих нікелем або латунню, різних видів полімерних матеріалів, гуми, скла, бетону, деревини. Не знебарвлюють і не зменшують міцність тканин, полегшують і покращують якість прання текстильних виробів. рН концентрату $10,5 \pm 1,5$.

Спектр антимікробної дії: «Саніфект» має антимікробні властивості проти широкого спектра грам + і грам- бактерій, включаючи збудників гнійно-септичних і

внутрішньолікарняних інфекцій, холери, туберкульозу, легіонельозу; вірусів; патогенних грибів роду *Candida*, збудників дерматомікозів, цвілевих грибів, а також володіє спороцидною дією [31].

2) Повна назва засобу – Багатоцільовий мийний засіб «САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ-САНАЦІЯ»

Виробник - «ІНТЕРДЕЗ» (Україна)

Склад засобу: Містить; аніонні ПАР (5-15), амфотерні ПАР <5, неіоногенні ПАР <5, комплексонат, консервант, ароматизатор (або без нього за вимогою споживача), вода підготовлена. Засіб не містить фосфатів.

Форма випуску, призначення і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб виробляється у формі концентрату і являє собою рідину від безбарвного до коричневого кольору із запахом ароматизатора (або без нього за вимогою споживача). Не агресивний по відношенню до матеріалів, ефективно видаляє з поверхонь і не фіксує на них різноманітні органічні (у т.ч. біологічні рідини), неорганічні та комбіновані забруднення, усуває неприємні запахи. Не залишає після миття плям та нальоту, рН засобу – $8,5 \pm 1,5$.

Мийна здатність, % – >80 (відповідає нормі для лужних технічних мийних засобів згідно СОУ МПП 71.100-235:2008);

Здатність поверхнево-активних речовин до первинного біологічного розкладання, % – >80 .

Спектр антимікробної дії: ефективний проти грампозитивних та грамнегативних вегетативних бактерій, грибів, ліпофільних вірусів.

Для дезинфекції обладнання використовують робочий розчин з концентрацією 2% [32].

3) Повна назва засобу – «МАКСИСАН»

Виробник – УНВЦ проблем дезінфекції (Україна)

Склад засобу: Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук (не менше 50%) і допоміжних компонентів. Не містить барвника й ароматизатора. Нейтральний рН концентрату і робочих розчинів.

Форма випуску, призначення і фізико-хімічні властивості засобу. Максисан добре змішується з холодною і гарячою водою в будь-якому співвідношенні. Водні розчини прозорі, мають мийну дію, легко змиваються з оброблених поверхонь, не залишають потьоків і нальоту, не фіксують органічні забруднення на оброблюваних об'єктах; розчини ефективні при високому білковому навантаженні, тобто для обробки сильно забруднених об'єктів; можливість підвищення антимікробних і мийних властивостей при використанні нагрітих робочих розчинів і посилення їх мийних властивостей при додаванні кальцинованої соди. Відсутність корозійної й іншої шкідливої дії на матеріали оброблюваних об'єктів, виготовлених з металів (в т. ч. алюмінію), скла, полімерних матеріалів, гуми, деревини, на лакофарбове і гальванічне покриття.

Спектр антимікробної дії: Максисан має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* і *S. aureus Methicillin Resistant*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium* *Vancomycin Resistant*, *Yersinia enterocolitica*), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, СНІДу, герпесу, грипу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії. При застосуванні робочих розчинів підвищеної температури антимікробна активність розчинів засобу значно посилюється [33].

4) Повна назва засобу – «САНІМАКС»

Виробник - УНВЦ проблем дезінфекції (Україна)

Склад засобу: Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук (не менше 50%) і допоміжних компонентів. Не містить барвника й ароматизатора. Нейтральний рН концентрату і робочих розчинів.

Форма випуску, призначення і фізико-хімічні властивості засобу. Максисан добре змішується з холодною і гарячою водою в будь-якому співвідношенні. Водні розчини прозорі, мають мийну дію, легко змиваються з оброблених поверхонь, не залишають патьоків і нальоту, не фіксують органічні забруднення на оброблюваних

об'єктах; розчини ефективні при високому білковому навантаженні, тобто для обробки сильно забруднених об'єктів; можливість підвищення антимікробних і мийних властивостей при використанні нагрітих робочих розчинів і посилення їх мийних властивостей при додаванні кальцинованої соди. Відсутність корозійної й іншої шкідливої дії на матеріали оброблюваних об'єктів, виготовлених з металів (в т. ч. алюмінію), скла, полімерних матеріалів, гуми, деревини, на лакофарбове і гальванічне покриття.

Спектр антимікробної дії: Максисан має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* і *S. aureus Methicillin Resistant*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli O157: H7*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium Vancomycin Resistant*, *Yersinia enterocolitica*), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, СНІДу, герпесу, грипу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії. При застосуванні робочих розчинів підвищеної температури антимікробна активність розчинів засобу значно посилюється [34].

5.5 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу і виробничого синтезу кіллер-токсинів

Для виробничого біосинтезу кіллер-токсинів використовується середовище складу (г/л) [13]:

- Дріжджовий екстракт: – 3
- Солодовий екстракт: – 3
- Пептон: – 5
- Глюкоза: – 10

Виробничий біосинтез реалізують у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовку посівного матеріалу проходить у три стадії (у колбах на качалках, в інокуляторі об'ємом 0,1 і 0,01 м³).

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,6 л), для вирощування в інокуляторах і виробничого біосинтезу – безпосередньо у самих

апаратах при рН 4,4. З цією метою необхідно передбачити у технологічній схемі відповідні допоміжні роботи – підготовку 6%-их розчинів HCl.

Для стерилізації солодового, дріжджового екстракту, глюкозу та пептон потрібно витримувати в автоклаві (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв), після розчин охолоджують та фільтрують.

Також окремо слід приготувати розчин SDS, який являється стимулятором біосинтезу кілер-токсинів і вноситься лише на стадії виробничого біосинтезу.

5.5.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,66 л).

Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: солодовий екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,15 МПа, 30 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл. 5.5:*

Таблиця 5.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 660 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Солодовий екстракт	3	1,98	А	660
Дріжджовий екстракт	3	1,98		
Глюкоза	5	3,3		
Пептон	10	6,6		
Вода	-	660 (мл)		
Усього				660

5.5.2. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Стерилізація 5,94 л поживного середовища, здійснюється у відповідному посівному апараті.

Композиція А: солодовий екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,15 МПа, 30 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л наведений у *табл. 5.6* При розрахунку потрібно врахувати 594 мл інокуляту. Тому об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 5,3 л.

Таблиця 5.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 10 л (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,94 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Солодовий екстракт	3	17,8	А	4,7
Дріжджовий екстракт	3	17,8		
Глюкоза	5	29,7		
Пептон	10	59,4		
Вода	-	4,7 (л)		
Конденсат		594(мл)	-	0,594
Усього				5,3

5.5.3. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Стерилізація 54 л поживного середовища, здійснюється у відповідному посівному апараті:

Композиція А: солодовий екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,15 МПа, 30 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л наведений у *табл. 5.7* При розрахунку потрібно врахувати 5,4 л інокуляту. Тому об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 48,6 л.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 100 л ($K_3 = 0,6$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 54 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Солодовий екстракт	3	162	А	43,2
Дріжджовий екстракт	3	162		
Глюкоза	5	270		
Пептон	10	540		
Вода	-	42 (л)		
Конденсат		5,4(л)	-	5,4
Усього				48,6

5.5.4. Вирощування інокуляту у ферментері об'ємом 1000 л

Стерилізація 500 л поживного середовища, здійснюється у відповідному посівному апараті, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: солодовий екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,15 МПа, 30 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м³ наведений у табл. 5.8 При розрахунку потрібно врахувати 50 л інокуляту. Тому об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 450 л.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 1 м³ ($K_3 = 0,6$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 500л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Солодовий екстракт	3	1500	А	393
Дріжджовий екстракт	3	1500		
Глюкоза	5	2500		
Пептон	10	5000		
Вода	-	383(л)		
Вода	-	6,2 (л)		
Конденсат		50(л)	-	50
Усього				450

5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Оскільки процес ферментації повинен проходити за кислого значення рН (4,4) [13], то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище підкислюють 6%-им розчином HCl.

До складу поживного середовища входять компоненти, які при перемішуванні у інокуляторах та ферментері будуть утворювати піну. Тому для зменшення рівня піни потрібно використати механічний піногасник, а також датчик який повідомляє про рівень піни. Завдяки використанню механічного піногасника зменшаться економічні витрати порівняно з використанням органічного або хімічного піногасника.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

- підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- для змішування та розчинення композиції А: (50 л);
- для змішування та розчинення компо

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу кіллер токсинів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник. Виробник: («Вент Устрій»). Температура повітря до 700 °С; матеріал корпусу: Нержавіюча сталь [1]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр касетний ФБВ 100. Виробник: («Вентс»). Фільтрувальний матеріал: нетканого полотна із синтетичних волокон; 300 м ³ /год; габаритні розміри, мм: 175 x 233 x 123 [2]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий VS 23 Виробник: («Gardner Denver»). Продуктивність: 159 м ³ /год; максимальний робочий тиск: до від 5 до 10 бар; потужність: 22 кВт; габаритні розміри, мм: 1345x880x1612 [3]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий циклічний рефрижераторний осушувач GDD40F-4S. Виробник: («Gardner Denver»). Продуктивність: 324 м ³ /год; потужність: 0.54 кВт; габарити, мм: 423 x 567 x 771 [4]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер. Виробник: («Пневмотехника»). Об'єм, л: 500 л; максимальний тиск: 16 бар; габаритні розміри, мм: 600 x 2110 [5]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник трирядний. Виробник: («Roен Est»). Максимальний робочий тиск: 1,6 МПа; допустима температура води: 130°С; габаритні розміри, мм: 740 x 192 x 440 [6]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Суцільнолитий фільтр GDF082 серії Р. Виробник: («Gardner Denver»). Продуктивність: 492 м ³ /год; максимальний тиск: до 17 бар; максимальна температура повітря: до 80 °С; ступінь очищення: 1 мікрон; габаритні розміри, мм: 129 x 409 x 2,36 [7]

НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ

Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробник		Гафійчук А.Р.		
Керівник		Красінько В.О.		
Н. контр				
Консульт				
Зав. каф.		Стабніков В.П.		

**РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ
ОБЛАДНАННЯ**

Літера	Аркуш	Аркушів
	54	4
Кафедра БТМ		

Продовження таблиці 6.1

I-8	Інокулятор	1	Біореактор НАВІТАТ cell dw 10 об'ємом 10 л («ІКА Bioreactors»). Матеріал корпусу: боросилікатне скло; матеріал кришки реактора: нержавіюча сталь; забезпечує низькі швидкості для м'якого змішування клітинних культур; із датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури; манометр; габаритні розміри, мм: 300 x 710 x 300 [8]
ІФ-9	Індивідуальний фільтр	1	Суцільнолитий фільтр GDF013 серії G. Виробник: («Gardner Denver»). Продуктивність – до 78 м ³ /год; робоча температура до 80°C; габаритні розміри, мм: 98 x 280 x 1,07 [7]
P-10	Реактор	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л («Yeto Machinery»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою; потужність двигуна: 4 кВт; частота перемішування 0-63об/хв; габаритні розміри, мм: 1000 x 1100 x 1550 [10]
H-11	Насос перестальтичний	1	Перистальтичний насос KRONOS («SEKO»). Максимальна потужність: до 2 Вт; продуктивність: до 25 л/год (0,4 л/хв); висота самовсмоктування 6 м; [11]
I-12	Інокулятор	1	Біореактор Biostat D-DCU об'ємом 100 л («Sartorius»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; можливості вимірювання і контролю рН, рО ₂ , температури, каламутності, піни, тиску; габаритні розміри, мм: 1950 x 2560 x 1570 [12]
ІФ-13	Індивідуальний фільтр	1	Суцільнолитий фільтр GDF013 серії G. Виробник: («Gardner Denver»). Продуктивність – до 78 м ³ /год; робоча температура до 80°C; габаритні розміри, мм: 98 x 280 x 1,07 [7]
P-14	Реактор	1	Реактор-змішувач об'ємом 500 л («ТАНЛІЕТ»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою; потужність двигуна: 0.75 кВт; частота перемішування 36~53об/хв; габаритні розміри, мм: 1150 x 2200 x 950 [13]
Л-15	Лічильник води	1	Лічильник холодної води Мокрохід КУ-1 R160 DN15 («Baylan»). Матеріал корпусу: латунь; мінімальна потужність: 0,33 л/хв; тип лічильника: механічний; робочий тиск: 1,6 МПа; температура води: до 50 °С [14]
H-16	Насос мембранний	1	Мембранний насос для рідин RHOENIX («Fluimas»). продуктивність: 20 л/хв; висота підйому до 70 м; габаритні розміри, мм: 146x96x165 [15]

Продовження таблиці 6.1

ФР-17	Ферментер	1	Ферментер ВІО1000 об'ємом 1 м ³ («Maruti Engineering Works» - Індія). Матеріал: контактні деталі з нержавіючої сталі 316L і зовнішня облицювання з нержавіючої сталі 304; оснащений барботером, лічильниками, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури; оснащений пристроєм для захисту від піни; мішалка 50-400 об/хв; коефіцієнт заповнення до 0,8; тиск в середині: 0,4 МПа; габаритні розміри, мм: 890 x 1600 [16]
ІФ-18	Індивідуальний фільтр	1	Суцільнолитий фільтр GDF013 серії G. Виробник: («Gardner Denver»). Продуктивність – до 78 м ³ /год; робоча температура до 80°C; габаритні розміри, мм: 98 x 280 x 1,07 [7]
Р-19	Реактор	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л («Yeto Machinery»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою; потужність двигуна: 4 кВт; частота перемішування 0-63 об/хв; габаритні розміри, мм: 1000 x 1100 x 1550 [10]
Н-20	Насос перестальтичний	1	Перистальтический насос KRONOS («SEKO»). Максимальна потужність: до 2 Вт; продуктивність: до 25 л/год (0,4 л/хв); висота самовсмоктування 6 м; [11]
Ф-21	Система мембранних фільтрів	1	Фільтраційні системи 1-секційна система. Виробник («Microsart»); Матеріал: Нержавіюча сталь 316L; матеріал фільтру: нітрат целюлози 0,2мкм; габаритні розміри, мм: 176 × 120 × 98 [17].

- 1) <https://rastopi.com.ua/p1298199905-komplekt-dymohoda-diametr.html>
- 2) <https://vents-shop.com.ua/kassetnyy-filtr-vents-fbv-100/>
- 3) <https://compressors.ua/gvyntovi-povitryani-kompresory/esm-vs30-45>
- 4) <https://compressors.ua/refryzheratorni-osushuvachi-stysnenogo-povitrya-ta-gaziv/ciklicheskie-refrizheratorny-osushiteli-gddf-es-s-proizvoditelnostju-ot-3-do-4-m3-min>
- 5) <https://compressors.in.ua/ua/p1660647301-resiver-500-bar.html>
- 6) <https://prom.ua/ua/p864759481-teploobmennik-roen-est.html?&primelead=NC4z>
- 7) https://compressors.ua/files/product-id168/21716_Filters_Brochure.pdf
- 8) <https://www.ika.com/en/Products-LabEq/Bioreactors-pg233/HABITAT-cell-dw-10-10007652/Technical-Data-cptd.html>
- 9) https://compressors.ua/files/product-id168/21716_Filters_Brochure.pdf

- 10) https://www.alibaba.com/product-detail/5L-10L-20L-30L-small-batch_62530702235.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.272b1c43XgkabV
- 11) <https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-kronos-ksfm0025m1000-25-l-god-0-1-bar-santoprene/>
- 12) <https://www.sartorius.com/download/10102/broch-biostat-d-dcu-sbi1512-e-data.pdf>
- 13) https://www.alibaba.com/product-detail/304-stainless-steel-reaction-tank-mixer_1600315082870.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.724c28da3Iuyok
- 14)
- 15) https://etatronds.com.ua/p1932646245-membrannyj-pnevmaticheskij-nasos.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA1McrBhAoEiwAC2d64fVqNsXG-ApvViF3bykivorXTo0rv2bRSzoQJpCwLI3sqTf90gOuShoC80gQAvD_BwE
- 16) <https://www.indiamart.com/proddetail/1000-l-jecketed-fermenter-bioreactor-15553699248.html>
- 17) <https://sartorius.com.ua/mikrobiologiya/filtracijni-sistemi-microsart-dlya-mikrobiologichnogo-kontrolyu/>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КІЛЛЕР-ТОКСИНУ

Технологічна схема біосинтезу кілер-токсину *Torulaspota delbrueckii* включає допоміжні роботи та основний технологічний процес. До стадій допоміжних робіт належать: санітарна підготовка та підготовка аераційного повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ, а також приготування титрувального агента (6%-й HCl). Стадії основного технологічного процесу включають підготовку посівного матеріалу та біосинтез кілер-токсину. [35].

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання виробничих приміщень включає в себе протирання панелей та підлоги за допомогою вологих ганчірок [36].

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проходить раз на тиждень та включає окрім підлоги також миття дверей, стін та вікон. Після прибирання проводять мікробіологічний контроль поверхонь [36].

ДР 1.3 Підготовка обладнання та допоміжних матеріалів

Підготовка обладнання, як частина санітарної підготовки виробництва, спрямована на забезпечення необхідного рівня чистоти та асептичності. Вона включає миття та стерилізацію знімних частин (вузлів) або обробку внутрішніх і зовнішніх поверхонь спеціальними мийними та дезінфікуючими засобами. Ці процедури виконуються перед або після технологічного процесу.

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>		<i>Гафійчук А.Р.</i>			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ КІЛЛЕР- ТОКСИНУ	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>					58	9
<i>Н. контр</i>						Кафедра БТМ		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ДР 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання

Для очищення обладнання та комунікацій використовують мийні розчини, які підігрівають до температури 55°C. Робочий розчин подається системою СІР відповідно до встановленого режиму миття: 15 хв промивання, 30 хв миття розчином, 15 хв ополіскування. Мийний розчин циркулює і повторно використовується для очищення наступного обладнання. Після кількох циклів миття відпрацьовані мийні розчини та вода направляються на утилізацію [36].

ДР 1.3.2 Технічний огляд

Після очищення та ополіскування ємного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих нещільностей у комунікаціях та запірній апаратурі на обладнанні. У разі виявлення таких нещільностей виконують підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

Ємнісне обладнання перевіряється на герметичність при тиску 0,05-0,07 МПа. Якщо тиск не падає протягом 30 хвилин, обладнання вважається герметичним. У випадку спостереження падіння тиску на 0,001 МПа і більше, обладнання вважається не герметичним і проводиться пошук місця витоку. Фланцеві з'єднання і зварні шви омилують розчином господарського мила під тиском повітря 0,05-0,07 МПа для перевірки на герметичність. Наявність витоку може свідчити про появу бульбашок повітря.

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Для стерилізації апарата, спочатку подають пар і нагрівають його до 80–90 °С. Відкривають всю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і направляють пар прямо до апарата. В цей час обов'язково відкривають вентиль для видалення повітря з апарата. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і утримують протягом 1 години. Після цього закривають парову арматуру, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку - холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003 - 0,005$ МПа

ДР 1.4 Підготовка одягу персоналу

Прання, полоскання і сушіння одягу проводять в пральній машині згідно з інструкцією. Для прання використовують синтетичні миючі засоби для автоматичних пральних машин, що характеризуються низькими піноутворюючими властивостями. Одяг завантажують в пральну машину, заливають воду очищену, профільтровану через мембранний фільтр з розміром пор 5,0 мкм і засипають миючий засіб. На кожен кілограм одягу повинно припадати не менше 10 л розчину миючого засобу. Рекомендована температура для змішаних тканин 30–35°C, для нейлону – 50–55 °С, для поліефірних тканин – 60–67 °С.

Після закінчення прання одяг слід кілька разів прополоскати протягом 20–30 хв у воді очищеній, профільтрованій через мембранний фільтр з порами розміром не більше 5,0 мкм, спочатку – теплою, потім – холодною водою.

Просушений технологічний одяг укладають в мішок для стерилізації, наклеюють індикатор стерилізації і стерилізують в паровому стерилізаторі при температурі 120 ± 1 °С, надмірному тиску 0,10–0,11 МПа протягом 45 ± 1 хв [37].

ДР 1.5 Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає медичні огляди, допуск до роботи, дотримання гігієнічних вимог до працівників, використання захисного одягу, навчання та управління знаннями. Перед початком роботи персонал повинен пройти навчання, атестацію та санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфікацію 70%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки [37].

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою спеціального апарата для забору повітря (ПЗ-1), розташованого на найвищій точці будівлі на висоті 10 метрів, з обладнанням для стиснення та очищення зібраного повітря.

ДР 2.2. Попереднє очищення повітря від грубих часток

Первинне очищення виконується за допомогою фільтра грубого очищення (Ф-2), який гарантує ефективність очищення на рівні 85% та утримує частинки з діаметром 50 мікрметрів.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Повітря піддають процесу стиснення у компресорі (К-3). Під час цього процесу повітря нагрівається до температурного діапазону 120-200 °С, а тиск досягає значення 0,35 МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) за допомогою теплообмінника-охолоджувача (Т-4) Охолоджується до температури 25-30 °С Надмірна волога екстрагується через ресивер (Р-5), при цьому досягається рівень вологості повітря в межах 60-70%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°С. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Після нагрівання повітря (від ДР 1.5) його направляють до головного фільтра очищення (Ф-7), розташованого біля відділень ферментації. На цьому етапі ефективність очищення становить 95%.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) транспортується через трубопроводи безпосередньо через індивідуальні фільтри (ІФ-9, ІФ-13, ІФ-18), розміщених на кожному інокуляторі до. На цьому етапі рівень кінцевого очищення повітря досягає 99,999%.

ДР 3. Приготування титрувального розчину для підтримання оптимального рівня рН в посівному апараті об'ємом 10 л, 100 л, 1 м³

ДР 3.1. Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти для посівного апарату об'ємом 10 л

Для приготування 15 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 50 мл за допомогою мірного циліндра об'ємом 25 мл вносять 12,5 мл стерильної води і додають при постійному перемішуванні 2,5 мл 36%-ї HCl, що відміряється мірною

піпеткою об'ємом 5 мл. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 3.2. Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти для посівного апарату об'ємом 100 л

Для приготування 110 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 250 мл за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл вносять 91,5 мл стерильної води і додають при постійному перемішуванні 18,5 мл 36%-ї HCl, що відміряється мірним циліндром об'ємом 25 мл. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 3.3. Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти для посівного апарату об'ємом 1 м³

Для приготування 1000 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 2 л за допомогою мірного циліндра об'ємом 1000 мл вносять 832 мл стерильної води і додають при постійному перемішуванні 168 мл 36%-ї HCl, що відміряється мірним циліндром об'ємом 250 мл. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування 660 мл середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл.5.1* (розділ 5).

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованій склянці об'ємом 50 мл зважують компоненти поживного середовища: 1,98 г солодового екстракту; 1,98 г дріжджового екстракту; 3,3 г глюкози і 6,6 г пептону. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, та додають 660 мл питної води, за допомогою мірного циліндра на 1000 мл, та перемішують. Після цього закривають колбу ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С протягом 30 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування 5,94 л середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл.5.2* (розділ 5).

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованій склянці об'ємом 250 мл зважують компоненти поживного середовища: 17,8 г солодового екстракту, 17,8 г дріжджового екстракту, 29,7 г глюкози та 59,4 г пептону. Для попереднього розчинення компонентів їх поміщають у стерильну колбу об'ємом 1 л, додають 0,5 л води (із загального об'єму) і розмішують до повного розчинення. Потім отриманий розчин перекачують самоплином у інокулятор об'ємом 10 л (І-8), додають 4,1 л решти води та стерилізують при 112 °С протягом 30 хв, подаючи гостру пару і глуху пару в сорочку інокулятора. Далі додають 6%-й розчин НСІ (від ДР 3.1.) до досягнення рН 4.4.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування 54 л середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл.5.3* (розділ 5).

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 162 г солодового екстракту; 162 г дріжджового екстракту; 270 г глюкози і 540 г пептону.

Для попереднього розчинення компонентів наважку поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-10) та додають 7 л питної води із загального об'єму, включають мішалку для повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують перестальтичним насосом (Н-11) в інокулятор об'ємом 100 л (І-12) після чого додають залишок води та стерилізують при 112 °С, 30 хв з одночасною подачею гострої пари і глухої пари у сорочку інокулятора та додають 6%-й розчин НСІ (від ДР 3.2.) до досягнення рН 4.4.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування 500 л середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл.5.4* (розділ 5).

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1500 г солодового екстракту; 1500 г дріжджового екстракту; 2500 г глюкози і 5000 г пептону. Для попереднього розчинення компонентів наважку поміщають в реактор об'ємом 500 л (Р-14) та додають 383 л питної води за допомогою лічильника води (Л-15) із загального об'єму, включають мішалку для повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують мембранним насосом (Н-16) у ферментер об'ємом 1 м³ (ФР-17) та стерилізують при 112 °С, 30 хв з одночасною подачею гострої пари і глухої пари у сорочку ферментера та додають 6%-й розчин НСІ (від *ДР 3.1.1*) до досягнення рН 4.4.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

У стерильних умовах потрібно приготувати розчин SDS, який являється стимулятором біосинтезу кілер-токсинів. На технічних вагах у попередньо відтарованій колбі об'ємом 2 л, потрібно зважити 1000 гр натрій додецилсульфат. Для попереднього розчинення наважку поміщають в стерильний реактор об'ємом 10 л (Р-19) та додають 7,7 л питної води, із загального об'єму, та розмішують до повного розчинення.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Torulaspora delbrueckii* зберігають у пробірках зі скошеним агаром на основі дріжджового екстракту за температури 4 °С у холодильнику. Пересіви здійснюють кожні 3–4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *Torulaspora delbrueckii*, що зберігається у пробірках з вказаним середовищем (*ТП 5.1*), розсівають петлею на чашки Петрі з дріжджово-

пептон-декстрозним агаром для одержання ізолюваних колоній. Вирощують в термостаті при температурі 30°C та зберігають при 4°C до потреби.

ТП 5.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізолювані колонії *Torulaspora delbrueckii* із чашок Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним дріжджово-пептон-декстрозним агаризованим середовищем (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). Тривалість культивування становить 72 год при температурі 30 °С.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л зі стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) додають стерильний 6%-й розчин НСІ (від ДР 3.1), доводячи рН середовища до 4,4. Розчин перемішують і розливають по 132 мл у 5 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Torulaspora delbrueckii* (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, відбирають стерильною піпеткою одержану суспензію дріжджів і вносять у качалочні колби із поживним середовищем та закривають ватно-марлевым корком. Одну пробірку із суспензією клітин використовують для засіву однієї колби.

Культивують на качалках (150 об/хв) при температурі 30°C упродовж 48 год, після чого здійснюють мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси за оптичною густиною.

ТП 5.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л

У інокулятор (І-8) об'ємом 10 л з композицією А (від ДР 4.2.1) додають титрувальний 6%-й розчин НСІ (від ДР 3.1), доводячи рН середовища до 4,4. Після підкислення середовища, через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 5.4) Культивують при температурі 30°C упродовж 48 год.

З періодичністю (кожні 8 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, джерел вуглецевого і азотного живлення.

ТП 5.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л

У інокулятор (І-12) об'ємом 100 л з композицією А (від ДР 4.3.1) додають титрувальний 6%-й розчин НСІ (від ДР 2.2), доводячи рН середовища до 4,4.

Через трубу перетискування подають з інокулятора (І-12) посівний матеріал (від ТП 5.5). Культивують при температурі 30°C упродовж 48 год. Кожні 7-8 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси, джерел вуглецевого та азотного живлення.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Вирощування культури в ферментері об'ємом 1 м³

У виробничий ферментер (ФР-17) об'ємом 1 м³ з композицією А (від ДР 4.4.1), додають запасний 6%-й розчин НСІ (від ДР 3.3), доводячи рН середовища до 4,4. Через трубу перетискування подають з інокулятора (І-12) посівний матеріал (від ТП 5.6). Після 4-ох годин культивування за допомогою перестальтичного насосу (Н-20) додають композицію Б з реактора (Р-19), яка являється стимулятором біосинтезу кілер-токсинів. Після чого культивують при температурі 30°C упродовж 72 год. Підтримання рО₂ на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

ЗВ 7. Знешкодження відходів

Застосування очисної споруди СПБ 6 (PROMTEHVOD, Україна) для знешкодження стічних вод від промислового виробництва (від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1), побутових та атмосферних. Очищену воду спускають в каналізацію.

Використання головних фільтрів, що йдуть у комплекті з інокуляторами (І-80, І-12) та ферментером (Фр-17). для очищення відпрацьованого повітря. Очищене повітря потрапляє в атмосферу.

Знешкодження біомаси, твердих відходів на фільтрах, непридатних хімічних реактивів та інших відходів.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Культивування дріжджів проходить в асептичних умовах, і з цього можна зробити висновок і сказати, що є необхідність у проведенні мікробіологічного контролю на усіх етапах промислового виробництва, щоб переконатися у відсутності контамінатів. Впродовж культивування мікроорганізму кожні 8 години відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю поживних середовищ, посівного матеріалу, а також визначають концентрацію біомаси, джерела вуглецю та азоту у середовищі.

Відібрані ізоляти субкультивували методом штрихової пластини на чашках з Дріжджовим манітоловим агаром (YMA) та інкубували при 30 °С протягом 48 годин, щоб перевірити їхню чистоту.

Підготовка вихідних культур: вихідні культури готували наступними способом:

Очищені ізоляти, які підлягали заморожуванню, вирощували протягом приблизно 24 годин в 1 мл PDB (бульйону картопляної декстрази) у флаконі об'ємом 5 мл перед додаванням 400 мкл 60% розчину гліцерину у воді. Потім ці флакони добре струшували, щоб перемішати, а потім зберігали при -20 °С.

8.1 Ідентифікація ізолятів дріжджів

Ідентифікацію дріжджів до видового рівня проводили на основі стандартних культуральних, морфологічних і фізіолого-біохімічних тестів.

Культуральні характеристики ізолятів дріжджів проводили шляхом штрихового культивування ізолятів на чашках YMA та інкубували при 30 °С протягом 48 годин, а потім спостерігали за такими характеристиками колоній:

- Форма: форми ізольованих колоній були зареєстровані як круглі або неправильні.

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Гафійчук А.Р.			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Красінько В.О.					67	12
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

- Колір: колір був зафіксований як кремовий, кремово-білий або білий.
- Край: край ізолюваних колоній був зареєстрований як цілий, зубчастий, лопатевий або хвилястий.
- Непрозорість: непрозорість ізолюваних колоній реєстрували як непрозору, напівпрозору або прозору.
- Підйом: підйом реєструвався як піднятий, опуклий або пупковий.
- Поверхня: Поверхня була записана як шорстка або гладка.
- Консистенція: консистенцію зареєстровано як в'язку [38].

8.2 Морфологічна характеристика

Для визначення морфології дріжджових клітин і типу розмноження культури досліджували мікроскопічно. Вегетативні клітини спостерігали після 3 днів інкубації при 30 °С у середовищі YMA. Після чого дані клітини субкультивували щомісяця для перевірки життєздатності [39].

Після фарбування метиленовим синім за Леффлером і фарбування за Грамом клітини спостерігали під складним мікроскопом для морфологічного дослідження цих дріжджових ізолятів, де вегетативні клітини *Torulasporea delbrueckii* виглядають як грам- позитивні клітини (фіолетовий) (Рис. 8.1).

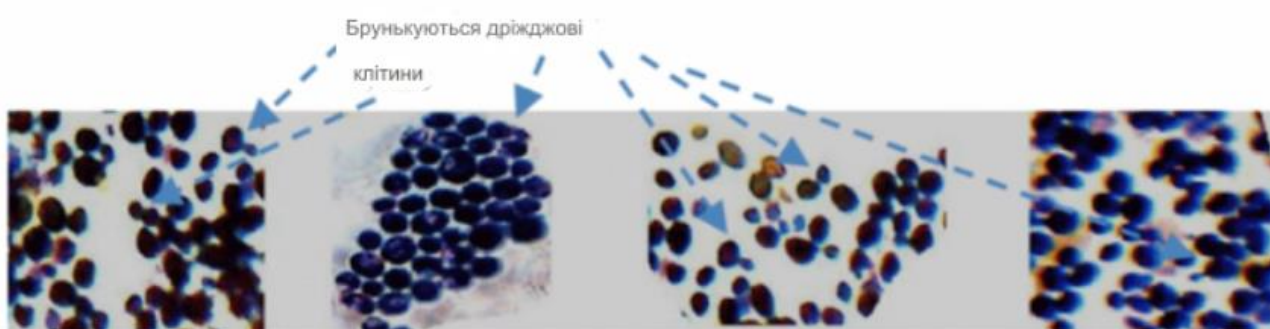


Рис. 8.1 Мікроскопічні фотографії ізолятів дріжджів

8.3 Біохімічна характеристика

Біохімічні методи визначення характеристик базуються на використанні джерел вуглецю та азоту. Здатність штамів утилізувати глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, лактозу та етанол як єдине джерело вуглецю.

8.4 Ферментація вуглеводів

Бромкрезоловий пурпурний вуглеводний (2%) ферментаційний бульйон (триптон 10 г, NaCl 5 г, дріжджовий екстракт 5 г, бромкрезоловий пурпурний 1% розчин 2,5 мл на літр) готували шляхом додавання всіх інгредієнтів (крім індикатора) до деіонізованої води та розчиняли на пару. Після охолодження рН доводили до 7,2 і додавали індикатор. Пізніше 5–10 мл цього середовища розподіляли в пробірки з гвинтовими кришками і стерилізували в автоклаві. Після охолодження при кімнатній температурі їх засівали 48-годинною свіжою культурою ізолятів дріжджів за допомогою стерильної петлі та інкубували при 30 °С і досліджували щодня протягом 5 днів. Швидка зміна (протягом 2 днів) кольору з фіолетового на жовтий вказувала на позитивний результат, відсутність змін вказувала на негативний результат, а повільна зміна вказувала як слабку. Дві неінокульовані пробірки зберігалися як негативний контроль.

8.5 Методи визначення концентрації життєздатних клітин дріжджів

Цитометрія є одним з ефективних методів визначення життєздатності клітин. Для цього часто використовують проточний цитометр, який дозволяє аналізувати фізичні та хімічні характеристики клітин у суспензії. Цей метод дозволить точно визначати життєздатність клітин і розрізняти живі і мертві клітини за допомогою проточного цитометра.

Для визначення концентрації нежиттєздатних клітин застосовують флуоресцентний барвник, оксонол (PI), який забарвлює нежиттєздатні клітини, та був визнаний точним показником життєздатності дріжджових клітин. Аналіз дріжджів, пофарбованих оксонолом, можна проводити за допомогою проточного цитометра.

- Мембрани життєздатних клітин непроникні для PI, тому такі клітини залишаються нефлуоресцентними.
- Мембрана мертвих клітини дозволяє PI проникнути в клітину та зв'язатися з ДНК, в результаті чого клітини світяться червоним світлом під ультрафіолетовим.

Флуоресцеїн діацетат (FDA) – це флуоресцентний барвник, який проникає в живі клітини і метаболізується до флуоресцеїну, що світиться зеленим.

Живі клітини гідролізують FDA до флуоресцеїну, який накопичується в клітині і світиться зеленим.

Мертві клітини не мають активних естераз, тому не відбувається гідролізу FDA і клітини залишаються нефлуоресцентними.

Ці два барвники часто використовуються разом для одночасного визначення життєздатності та мертвих клітин в одному зразку.

- Живі клітини: Світяться зеленим.
- Мертві клітини: Світяться червоним.

Таким чином, цей метод дозволяє швидко та точно визначити життєздатність клітин за допомогою проточної цитометрії, використовуючи комбінацію флуоресцентних барвників [41].

8.6 Метод визначення вологості в сухих дріжджах діелектричним методом

Принцип методу базується на вимірюванні діелектричних властивостей зразка, які змінюються залежно від вмісту вологи. Вода має високий діелектричний постійний, тому зміна діелектричної проникності зразка дозволяє визначити вологість [42].

Переваги:

- Швидкість аналізу (вимірювання триває кілька секунд або хвилин).
- Можливість безперервного контролю вологості в процесах виробництва.

Недоліки:

- Необхідність ретельного калібрування для кожного типу зразка.
- Може потребувати спеціального обладнання.

8.7 Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Підготовка чашок Петрі: У попередньо стерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі наливають по 20-30 мл агаризованого середовища: сусло-агар (СА) для виявлення грибів та дріжджів і м'ясо-пептонний агар (МПА) для виявлення бактерій. Потім чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують при температурі 30°C протягом 2-3 діб, розташували їх кришками донизу.

Виконання посівів: Стерилізованою піпеткою відбирають 0,1 мл проби

простерилізованого середовища і наносять на поверхню відповідного культурного середовища. Проби рівномірно розподіляють стерильним шпателем. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають в термостат для інкубації: для МПА при температурі 32-34°C протягом 1-2 діб, а для СА при температурі 24-26°C протягом 3-5 діб.

Також необхідно візуально перевірити відсутність ознак росту мікроорганізмів на поверхні поживних середовищ. Якщо не виявлено жодних ознак росту, це свідчить про стерильність середовищ [42].

8.8. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Контроль чистоти культури здійснюється шляхом прямого висіву посівного матеріалу та культуральної рідини на агаризовані поживні середовища, а також мікроскопіюванням мікроорганізмів окремих колоній, що вирости після інкубації в термостаті. Паралельно проводиться мікроскопіювання зразків культуральної рідини для експрес-діагностики.

Прямий висів проводиться для виявлення сторонньої мікробіоти: культуральну рідину висівають на попередньо стерилізовані чашки Петрі з сусло-агаром (СА) для виявлення досліджуваних дріжджів *Torulaspota delbrueckii* та з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення сторонньої мікробіоти у вигляді бактерій. Чашки інкубують при температурі 28-30°C протягом 72 годин. Після цього чашки Петрі перевіряють на наявність сторонньої мікробіоти. За відсутності сторонньої мікробіоти на сусло-агарі можна спостерігати колонії *Torulaspota delbrueckii* діаметром від 1 до 3 мм, які зазвичай мають округлу або овальну форму, білого, кремового або жовтого кольору, і можуть бути гладкими або мати невеликі зубці по краях (рис. 8.2).

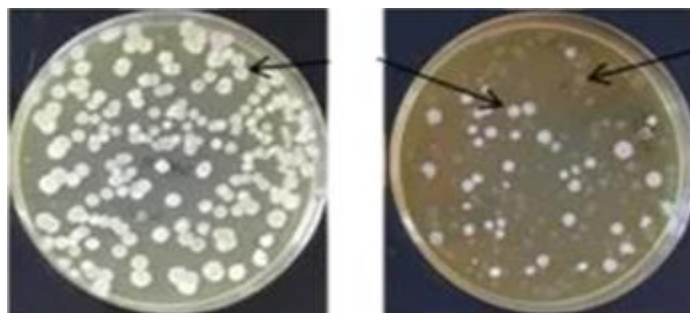


Рис. 8.2. Колонії дріжджів *Torulaspota delbruecki*, вирощених на сусло-агарі [43].

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препаратів «роздавлена крапля». Препарат потрібно готувати на предметному склі, яке попередньо знежирюють. Після нанесення на скло невеличкої краплі культуральної рідини, його покривають накривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом х40. За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Torulaspota delbruecki* (рис.8.3). діаметром 2–4 мкм сферичні з гладкою або бородавчастою клітинною стінкою [17].

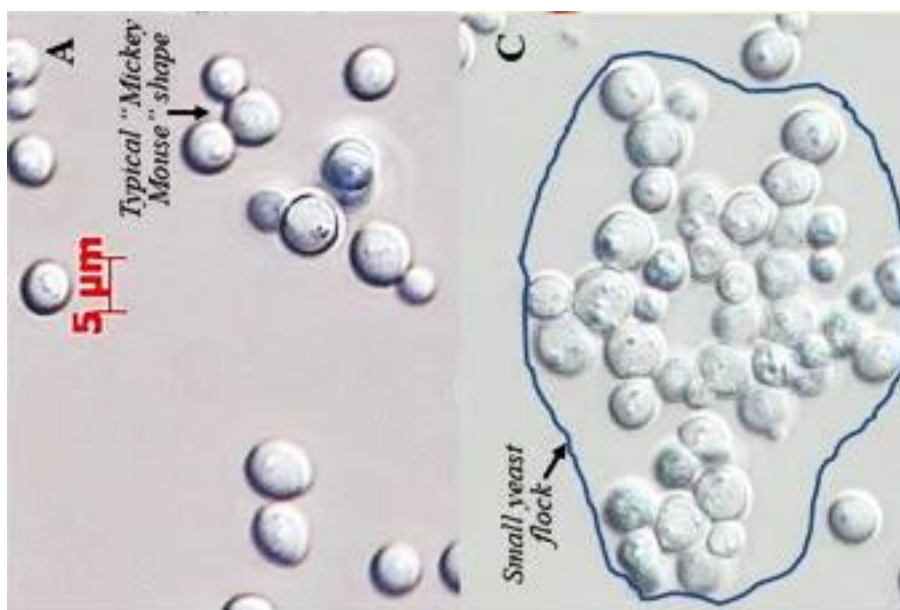


Рис. 8.3. Мікрофотографії клітин *Torulaspota delbruecki*, зроблені за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 600 з об'єктивом 60×.

8.9 Якісний метод визначення кіллер-токсина (QLM)

Оцінку чутливості кілер токсину проводили наступним чином: чашки Петрі із середовищем YEPD-M* засіюють тестовою культурою чутливих дріжджів та наносять товсті мазки культуральної рідини та інкубували при 18 ± 2 °C протягом 48-72 годин. Цільовий ізолят дріжджів на газоні був визначений як чутливий, коли спостерігалася чітка зона пригнічення росту навколо смуг культур-убивць. Аналізи проводили в двох повторах [44].

YEPD-MB* - дріжджовий екстракт 1 г/л, солодовий екстракт 3 г/л, глюкоза 20 г/л, пептон 2 г/л, агар 20 г/л, метиленовий синій 0,003, 0,5 М фосфат-цитратом при рН 4,6.

8.10. Визначення концентрації джерела вуглецю

Концентрацію глюкози визначають в чистій від мікроорганізмів культуральній рідині. Для одержання супернатанту культуральну рідину (100 мл) потрібно процентрифугувати протягом 20 хв при 3000 об/хв для видалення біомаси.

Визначення проводять глюкозооксидазним методом.

Принцип методу полягає в наступному: під дією ферменту глюкозооксидази глюкоза окислюється киснем з повітря, утворюючи перекис водню. Перекис водню, взаємодіючи з ферментом пероксидазою, окиснює ортотолідин, утворюючи забарвлену сполуку. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості глюкози в супернатанті.

Робочий реактив: в ацетатному буфері (80 мл) розчиняють глюкозооксидазу (2 мг) та пероксидазу (1 мг), потім додають 1%-ний розчин ортотолідину (1 мл), перемішують і доводять об'єм буферним розчином до 100 мл.

До супернатанту (1 мл) додають робочий реактив (3 мл) і обережно перемішують. Поступово починає з'являтися забарвлення, яке при кімнатній температурі досягає максимуму через 13-15 хв. Фотометрують при довжині хвилі 625 нм проти контрольного розчину (замість культуральної рідини містить фізіологічний розчин).

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком, на одній осі якого відкладено концентрацію глюкози (ммоль/л), а на іншій – величину екстинкції [45].

8.11 Визначення концентрації джерела азоту.

Джерелами азоту в середовищі для культивування *Torulaspora delbrueckii* є пептон, що містить амінний азот. Для визначення амінного азоту використовується метод формольного титрування. Цей метод базується на блокуванні формальдегідом вільних аміногруп амінокислот, після чого визначається кількість титрувального розчину, який витрачено на нейтралізацію карбоксильних груп (кількість яких пропорційна кількості амінних груп). Початок і кінець титрування визначається потенціометрично.

Необхідні реактиви:

- 0,1 н розчин гідроксиду натрію або соляної кислоти (0,1 моль/л)

- Формалін (40% розчин формальдегіду)
- 10% розчин гідроксиду натрію

Методика проведення:

- Підготувати культуральну рідину шляхом фільтрування для отримання безклітинного розчину.
- В колбу об'ємом 50 мл налити 10 мл отриманого фільтрату і довести об'єм водою до 20 мл.
- Помістити електроди потенціометра в отриманий розчин, довести Рн до 7,0, додаючи 0,1 н NaOH або 0,1 н HCl.
- Додати до нейтралізованого розчину 2 мл нейтрального формаліну (його Рн довести до 7,0 за допомогою 10% розчину NaOH), перемішати і, не виймаючи електроди, титрувати розчином 0,1 н NaOH до Рн 9,1.

Вміст амінного азоту в культуральній рідині визначають за допомогою спеціальної формули

$$X = \frac{V \times K \times 1,4}{C}, \text{ мг}$$

де, V – це кількість розчину 0,1 н NaOH, яка пішла на титрування розчину, мл;

K – це поправка до титру розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л);

1,4 – це кількість амінного азоту в мг, еквівалентне 1 мл розчину натріюгідроксиду (0,1 моль/л);

C – це кількість досліджуваного розчину, мл [46,47].

8.12 Карта постадійного контролю біосинтезу кіллер токсинів

Таблиця 8.1

Карта контрольних точок виробництва кіллер-токсинів.

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
1	2	3	4	5
Кт 2.1 Забір атмосферного повітря	Повітрязбірник Висота забору повітря	-	-	H = 11 м
Кт 2.2 Попереднє очищення повітря від грубих часток	Очищене повітря Ступінь очищення повітря після фільтра, перепад тисків	Технічний манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 85%, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря Температура, тиск	Технічний манометр, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35 Мпа, t = 120-200 °C
Кт 2.4 Охолодження повітря і видалення зайвої вологи	Охоложене повітря Температура, вологість	Технічний термометр, психрометр	Після охолодження та видалення вологи	t = 25-30 °C, W = 60-70%
Кт 2.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря Температура	Технічний термометр	Після нагрівання повітря	t = 45-50 °C
Кт 2.6 Очищення повітря у головному фільтрі	Очищене повітря Ступінь очищення повітря після фільтра, перепад тисків	Технічний манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95%, тиск згідно паспорту
Кт, Км 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря Ступінь очищення повітря після фільтра, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	Після очистки повітря у фільтрі індивідуального очищення	E = 99,999%,
Кх 3.1, 3.2, 3.3 Приготування стерильного 6% розчину хлоридної кислоти	Розчин соляної кислоти Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%

<p>Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках</p> <p>Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А</p> <p>Стерильність, температура, час</p>	<p>Годинник, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л</p> <p>Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А</p> <p>Стерильність, температура, час</p>	<p>Годинник, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л</p> <p>Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А</p> <p>Стерильність, температура, час</p>	<p>Годинник, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 4.4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³</p> <p>Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А</p> <p>Стерильність, температура, час</p>	<p>Годинник, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури</p>	<p>Робоча культура <i>Torulaspota delbrueckii</i></p> <p>Температура, час, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Холодильник, термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль</p>	<p>t = 4°C, τ = 3-4 місяці відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури</p>	<p>Робоча культура <i>Torulaspota delbrueckii</i></p> <p>Температура, час, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль здійснюється після вирощування культури</p>	<p>t = 30°C, τ = 72 год відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.3 Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах</p>	<p>Робоча культура <i>Torulaspota delbrueckii</i></p> <p>Температура, час, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль здійснюється після вирощування культури</p>	<p>t = 30°C, τ = 72 год відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал</p> <p>Температура, час, рівень рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр, рН- метр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та швидкість обертання, рівень рН, контролюються увесь час впродовж вирощування. Мікробіологічний контроль здійснюється після культивування</p>	<p>t = 30°C, τ = 48 год, W = 150 об/хв, рН = 4,4, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Продовження Таблиця 8.1

Кт, Км, Кх 5.5 <i>Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Посівний матеріал Температура, час, рівень рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр, датчик рН, годинник, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рівень рН, контролюються увесь час впродовж вирощування. Визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль здійснюються кожні 8 год, після культивування	t = 30°C, τ = 48 год, рН = 4,4, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.6 <i>Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л</i>	Посівний матеріал Температура, час, рівень рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр, датчик рН, годинник, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рівень рН, контролюються увесь час впродовж вирощування. Визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль здійснюються кожні 8 год, після культивування	t = 30°C, τ = 48 год, рН = 4,4, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.1 <i>Вирощування культури в ферментері об'ємом 1 м³</i>	Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, концентрація кілер-токсину	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, електронні ваги, мембранні фільтри, чашки петрі, мікробіологічний контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки контролюються автоматично впродовж усього часу вирощування. Визначення концентрації кілер-токсинів та мікробіологічний контроль здійснюються кожні 8 год і після культивування	t = 30°C, τ = 72 год, рН = 4,4, W = 150 об/хв, C _{КТ} = 27 мг/л, відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Відходи - це матеріали чи речовини, вони можуть бути органічними або неорганічними, включати в себе побутові сміття, відпрацьовані матеріали, рідини чи гази, і вимагають спеціальної обробки чи утилізації для зменшення негативного впливу на навколишнє середовище та здоров'я людини.

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи під час біосинтезу кілер-токсинів *Torulaspota delbrueckii* складаються з:

- відпрацьованих залишків мийних і дезінфікуючих засобів;
- відпрацьованої води для ополіскування обладнання.

Також необхідно обрати режим очищення стічних вод (безперервним або періодичним). Вибір залежить від загальних витрат стічних вод. Загальні витрати розраховують за середніми витратами стічних вод, які в свою чергу розраховуються знаючи об'єм стічних вод на масову одиницю продукції та добову потужність підприємства.

Нижче наведено відповідні розрахунки.

9.1.1. Розрахунок орієнтовного об'єму стічних вод

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Відомо, що для миття та дезінфекції обладнання за допомогою мобільної циркуляційної СІР-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму обладнання.

Відповідно до специфікації обладнання з курсового проекту, з ємкісного обладнання маємо: інокулятор І-8, реактор Р-10, інокулятор І-12, реактор Р-14, ферментер ФР-17, реактор Р-19. Таким чином, потрібно розрахувати геометричний об'єм ємностей:

НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробник	Гафійчук А.Р.			
Керівник	Красінько В.О.			
Н. контр				
Консульт				
Зав. каф.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА				
			Літера	Аркуш
				79
			Аркушів 7	
Кафедра БТМ				

$$\begin{aligned}
 V_{\text{ємностей}} &= V_{\text{інокулятору 1-8}} + V_{\text{реактору P-10}} + V_{\text{інокулятору I-12}} + V_{\text{реактору P-14}} + V_{\text{ферментеру Фр-17}} + \\
 &V_{\text{реактору P-19}} = \\
 &= 10 \text{ л} + 10 \text{ л} + 100 \text{ л} + 500 \text{ л} + 1000 \text{ л} + 10 \text{ л} = 1630 \text{ л}
 \end{aligned}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,2 = 1630 \text{ л} \times 0,2 = 326 \text{ л або}$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,3 = 1630 \text{ л} \times 0,3 = 489 \text{ л.}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 326 - 489 л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання, так як і об'єм мийно-дезінфікуючого розчину. Як розраховано вище, даний параметр дорівнює 326 - 489 л.

Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: 489 л + 489 л = 978 л.

Орієнтовний об'єм стічних вод на 1м³ супернатанту. Спочатку потрібно розрахувати приблизну кількість супернатанту, що утворюється за один виробничий цикл. Згідно з розрахунками курсової роботи, за один цикл отримуємо 500 л культуральної рідини з концентрацією абсолютно сухої біомаси 7,5 г/л. Після центрифугування біомаса не буде сухою, її вологість складатиме 70%. Таким чином, 70% від 7,5 г/л становить 5,25 г/л (вологість біомаси), а концентрація вологої біомаси буде 12,75 г/л. Отже, у 500 л культуральної рідини вміст вологої біомаси становить 6375 г. Оскільки основою культуральної рідини є вода, то 500 000 г - 6375 г = 493625 г супернатанту, або 494 л.

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 494 л супернатанту та 978 л стічних вод. Тоді на 1 м³ супернатанту припадає 1979 л (1,98 м³) стічних вод.

9.1.2. Визначення середніх витрат стічних вод промислового підприємства

Відповідно до ТЕО, річна потужність виробництва становить 72 кг дріжджів на рік. Беручи до уваги, що цільовий продукт синтезуються у кількості 7,5 г/л, можемо порахувати кількість культуральної рідини:

$$N_{\text{культ.рідини}} = 72 / 7,5 = 96000 \text{ л}$$

За врахуванням кількості циклів на рік, що становить 8, можемо порахувати, що за рік вийде така кількість супернатанту:

$$96000 - (494 * 27) = 39717 \text{ л} = 82\,662 \text{ л} = 82,7 \text{ м}^3$$

Враховуючи кількість трудоднів яка складає 45, можемо розрахувати добову потужність підприємства:

$$82,7 / 117 = 0,71 \text{ м}^3$$

Визначемо середні витрати виробничих стічних вод за зміну:

$$Q_{\text{в}} = q_{\text{в}} * n = 1,98 * 0,71 = 1,41 \text{ м}^3/\text{доба},$$

де $q_{\text{в}}$ - норма водовідведення в м^3 на одиницю продукції, яку випускає підприємство;

n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну.

Тепер ми можемо визначити середні витрати побутових стічних вод за зміну:

$$Q_{\text{п}} = q_{\text{п}} * N = 0,025 * 7 = 0,175 \text{ м}^3/\text{доба},$$

де $q_{\text{п}}$ - норма відведення побутових стічних вод в $\text{м}^3/\text{зм}$ на одного робітника.

Приймаємо для холодних цехів – $0,025 \text{ м}^3/(\text{зм}/\text{люд})$;

$N = 7$ - кількість робітників, шт (змінний майстер, мікробіолог, технолог, прибиральник, 2 апаратчики, оператор).

Перерахуємо знайдений показник на добу:

$$Q_{\text{п}} = (0,175 * 3 * 24) / 8 = 1,58 \text{ м}^3/\text{доба},$$

де, 8 - тривалість зміни, год;

24- тривалість доби, год;

3 - кількість змін на добу.

Обраховуючи загальні витрати атмосферних стічних вод, можна дане значення орієнтовано прийняти у об'ємах у 5-30 разів менше ніж витрати побутових стічних вод.

$$Q_{\text{а}} = Q_{\text{п}} / 5 = 0,175 / 7 = 0,025 \text{ м}^3/\text{доба}$$

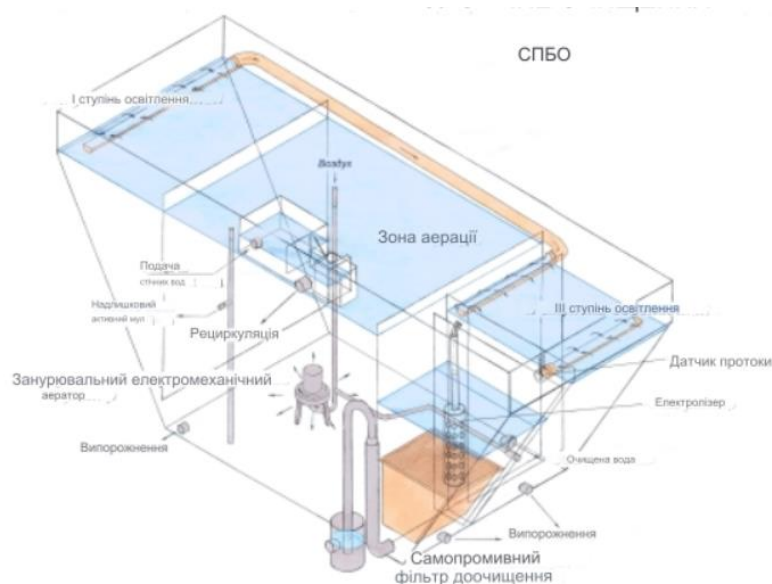
Отже, загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві:

$$Q_{\text{доба}} = Q_{\text{в}} + Q_{\text{п}} + Q_{\text{а}} = 1,79 + 1,58 + 0,025 = 3,395 \text{ м}^3/\text{доба}$$

9.1.3. Система очищення стічних вод

Оскільки витрати стічних вод, за попередніми розрахунками, не перевищують 100 м³/доба, їх доцільно очищати в періодичному режимі. Для нашого підприємства найкращим варіантом буде використання модульної очисної споруди «СПБО-6», призначеної для біологічного очищення господарсько-побутових і попередньо очищених виробничих стічних вод. Ця установка виготовлена в заводських умовах згідно з ТУ У 16458959-005-99 і являє собою металеву ємність зі спеціальним захисним покриттям.

Модульна станція «СПБО-6» (Рис. 9.1) технологічно виконана як аераційна установка, призначена для повного окислення з стабілізацією надлишкового мулу. У ній реалізована 6-ступінчаста технологія повного біологічного очищення стічних вод.



(Рис. 9.1) Установка повної біологічної очистки стічних вод СПБО-6

- **I-а ступінь. Вузол регулювання подачі стічної рідини, яка надходить в модульну станцію «СПБО»**

З розподільної чаші по самопливному трубопроводу стічні води подаються на «СПБО-6», безпосередньо в камеру гасіння напору (вузол регулювання подачі води). За допомогою шибера встановлюється необхідний витрата стічних вод, що надходять на механічну очистку модуля «СПБО-6». Надлишок стічних вод по самопливному трубопроводу повертається в усереднювальний резервуар, тягнучи за собою повітря, завдяки чому здійснюється процес додаткової аерації стічної рідини

і її перемішування усереднювачі-накопичувачі, що запобігає загнивання стічної рідини і збільшує ефект очищення.

- **II-а ступінь. Механічне очищення**

Стічні води самопливом надходять на вузол механічного очищення стічних вод (сито-контейнер). В ситі затримуються механічні домішки, фракцією більш 5мм. Видалення затриманих забруднень з сита здійснюється по мірі накопичення забруднень вручну.

- **III-а ступінь. Аерація стічних вод і перемішування їх з активним мулом**

Далі стічні води потрапляють в зону аерації (можлива комплектація установки анаеробною зоною). Зона аерації модульної станції «СПБО-6» призначена для повного окислення забруднень. У цій зоні стічна рідина насичується киснем і перемішується з активним мулом за допомогою заглибного імперного електромеханічного аератора типу «ВМ», який підтримує високу концентрацію активного мулу без потреби в системах подачі і розподілу повітря.

Додатково аераційна зона може бути обладнана об'ємно-блочним завантаженням, що інтенсифікує процес біологічного очищення та створює сприятливі умови для розвитку повільно зростаючих штамів мікроорганізмів – деструкторів важко окислюваних забруднень. Використання іммобілізованих мікроорганізмів підвищує надійність роботи очисних споруд, особливо при зміні витрати або складу стічних вод, що очищуються.

- **IV-я і V-я ступені. Освітлення стічних вод**

Освітлення стічних вод передбачено в двох камерах, перша з яких (IV-я ступінь) становить єдине ціле із зоною аерації. Стічна рідина протікає через обидві секції освітлення самопливом, при цьому обложений мул з першої камери повертається в зону аерації безперервно під дією гідродинамічних сил. Активний мул з другої камери освітлення (V-я ступінь) повертається в зону аерації безпосередньо за допомогою аератора.

- **VI-я ступінь. Попередня доочищення стічних вод**

Очищена вода з другої камери освітлення самопливом надходить на фільтр доочистки, який самостійно промивається, з плаваючою зернистим завантаженням (VI-я ступінь) і далі на випуск з модуля.

При відключенні електроенергії модуль «СПБО-6» працює як багатоступінчастий відстійник, забезпечуючи очищення стічних вод від зважених речовин, жирів і плаваючих забруднень приблизно на 50%. При відновленні електропостачання установка переходить в нормальний режим роботи [48].

9.2. Система знешкодження газоподібних відходів

Система знешкодження газоподібних відходів на біотехнологічному виробництві застосовує комплексний підхід до аналізу та ефективної обробки викидів. Газоподібні відходи, що утворюються в процесі виробництва, можуть містити різноманітні речовини та гази, тому їх знешкодження є критично важливим для забезпечення екологічної безпеки та відповідності стандартам.

Утворення газоподібних відходів, що містять аерозоль клітин, у вигляді відпрацьованого повітря після аерації культуральної рідини на стадіях:

- отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л
- отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л
- отримання посівного матеріалу у ферментері об'ємом 1000 л

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря:

Розрахуємо максимально необхідну кількість повітря для інокулятора на 10 л:

$$V_{15} = V_{\text{гф}} * K_3 = 0,010 * 0,6 = 0,006 * 2 = 0,012 \text{ м}^3/\text{хв} = 0,72 \text{ м}^3/\text{год.}$$

Розрахуємо максимально необхідну кількість повітря для інокулятора на 100 л:

$$V_{100} = V_{\text{гф}} * K_3 = 0,1 * 0,6 = 0,06 * 2 = 0,12 \text{ м}^3/\text{хв} = 7,2 \text{ м}^3/\text{год.}$$

Розрахуємо максимально необхідну кількість повітря для інокулятора на 1000 л:

$$V_{1000} = V_{\text{гф}} * K_3 = 1 * 0,6 = 0,6 * 2 = 1,2 \text{ м}^3/\text{хв} = 72 \text{ м}^3/\text{год.}$$

Розрахуємо максимально необхідну загальну кількість повітря на цикл:

$$V_{\text{заг}} = V_{15} + V_{100} + V_{1000} = (0,72 + 7,2 + 72) * 24 = 1918,1 \text{ м}^3$$

Враховуючи невеликий обсяг газоподібних викидів (1918,1 м³) та той факт, що використовуване обладнання складається з лабораторних пілотних ферментерів з основними фільтрами, які очищають повітря перед його викидом в атмосферу, додаткове оснащення або встановлення систем очищення відпрацьованого повітря не є необхідним.

9.3. Система знешкодження твердих відходів

Тверді відходи на підприємстві:

- біомаса *Torulasporea delbrueckii* після виробничого біосинтезу;
- фільтри;
- непридатні хімічні реактиви (реагенти, що залишаються після хімічних процесів, агаризовані середовища з чашок Петрі після мікробіологічного контролю, випадково розсипані солі при приготуванні поживних середовищ);
- пакувальні матеріали (картон, полівінілхлорид, поліетилен);
- скло (у результаті склобою лабораторного посуду);
- використані ганчірки, засоби індивідуального захисту.

Біомаса. Розрахуємо, скільки біомаси утвориться приблизно за один виробничий цикл. Згідно з попередніми розрахунками (див. пункт 9.1.1), очікується, що під час одного виробничого циклу утвориться близько 505 г вологої біомаси. Цю невелику кількість можна піддати інактивації в убійному автоклаві, а потім передати іншим підприємствам для виготовлення добрив.

Непридатні хімічні реактиви. Їх слід зберігати окремо в спеціально відведеній і промаркованій шафі, а потім передавати спеціалізованим організаціям для утилізації. Агаризовані середовища з чашок Петрі з вирослими колоніями також слід інактивувати в убійному автоклаві.

Пакувальні матеріали: рекомендується розділяти відходи, такі як макулатура, ПВХ, поліетилен, скло тощо, та складати їх у відповідні контейнери з кришками перед передачею на переробку у пункти прийому вторинної сировини.

Інші відходи. Вони мають бути зібрані в окремі контейнери з кришками (макулатура, ПВХ, поліетилен, скло і т.д.) та передані на переробку до пунктів прийому вторсировини

СПРИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Raffael Schaffrath, Friedhelm Meinhardt & Roland Klassen. *Yeast Killer Toxins: Fundamentals and Applications, Physiology and Genetics*. 2018, 1: 87-118. doi:10.1007/978-3-319-71740-1_3
2. Beatriz Padilla, José V. Gil, Paloma Manzanares. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, 411. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
3. María Leticia Villalba, Julieta Susana Sáez, Silvana del Monaco, Christian Ariel Lopes, Marcela Paula Sangorrín. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulasporea delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 217: 94-100. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006
4. Цапко С., Красінько В.. Кілер-токсини дріжджів як новітні природні антимікробні сполуки для харчової продукції. *Грааль науки*. (2021) (2-3), 196-201. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.02.04.2021.037>
5. Marquina D, Santos A, Peinado JM. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*. 2002 Jun;5(2):65-71. doi: 10.1007/s10123-002-0066-z.
6. Liu GL, Chi Z, Wang GY, Wang ZP, Li Y, Chi ZM. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2015,35 (2):222-34. doi: 10.3109/07388551.2013.833582.
7. Pfeiffer, P., Radler, F. Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2 . *Arch. Microbiol*. 1984, 137, 357–361 . <https://doi.org/10.1007/BF00410734>
8. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://homebeer.com.ua/vinnye-drojji-i-podkormki/71b>
9. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://brouwland.com/en/yeast-and-bacteria/105-dried-wine-yeast-bioferm-killer-7-g.html>
10. Gier S, Simon M, Gasparoni G, Khalifa S, Schulz MH, Schmitt MJ, Breinig F. Yeast Viral Killer Toxin K1 Induces Specific Host Cell Adaptions via Intrinsic Selection Pressure. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(4):e02446-19. doi: 10.1128/AEM.02446-19.

11. Radler F, Schmitt M. Killer Toxins of Yeasts: Inhibitors of Fermentation and Their Adsorption. *J Food Prot.* 1987, 50(3):234-238. doi: 10.4315/0362-028X-50.3.234.
12. Velázquez R, Zamora E, Álvarez ML, Hernández LM, Ramírez M. Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front Microbiol.* 2015 3;6:1222. doi: 10.3389/fmicb.2015.01222.
13. Abu-Mejdad, N.M.J.A., Al-Badran, A.I. & Al-Saadoon, A.H. Purification and characterization of two killer toxins originated from *Torulaspora delbrueckii* (Lindner) and *Wickerhamomyces anomalus* (E.C.Hansen) Kurtzman, Robnett, and Basehoar-Powers. *Bull Natl Res Cent* (2020). **44**, 48 <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00308-w>
14. Francesca Comitini, Natalia Di Pietro, Laura Zacchi, Ilaria Mannazzu, Maurizio Ciani. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology.* 2004, 8(150):2535-2541. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27145-0>
15. Izgu F, Altinbay D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo-beta-1,3-glucanase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004, 68(3):685-93. doi: 10.1271/bbb.68.685
16. Izgü F, Altinbay D, Türeli AE. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to Panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Microbiol Immunol.* 2007, 51(9):797-803. doi: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb03975.x.
17. Rocío Velázquez, Manuel Ramírez. *The Yeast Torulaspora delbrueckii: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking*, Enological Repercussions of Non-Saccharomyces Species. 2018, 4: 1-15. doi:10.3390/fermentation4040094
18. Warren Albertin ,Laura Chasseriaud ,Guillaume Comte,Aurélie Panfili,Adline Delcamp,Franck Salin,Philippe Marullo,Marina Bely. *Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast Torulaspora delbrueckii*, PLOS ONE. 2014, 9(4): 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0094246
19. MYCOBANK, *Torulaspora delbrueckii* . [Электронный ресурс] режим доступа:

20. Duchow Esther, Douglas H. C. Rhodomicrobium vannielii, a new photoheterotrophic bacterium, Department of Microbiology, University of Washington. 1949, 5: 409-416. [Електронний ресурс] режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC385647/pdf/jbacter00638-0019.pdf>
21. Marquina, D., Santos, A. & Peinado, J. Biology of killer yeasts. Int Microbiol 2002, 5: 65–71: <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>
22. Mark A. Bonn , Woo Gon Kim , Sora Kang & Meehee Cho Purchasing Wine Online: The Effects of Social Influence, Perceived Usefulness, Perceived Ease of Use, and Wine Involvement, Journal of Hospitality Marketing & Management 2016, 25:7: 841-869: <https://doi.org/10.1080/19368623.2016.1115382>
23. Fazio, N.A.; Russo, N.; Foti, P.; Pino, A.; Caggia, C.; Randazzo, C.L. Inside Current Winemaking Challenges: Exploiting the Potential of Conventional and Unconventional Yeasts. Microorganisms 2023: 11,1338h: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051338>
24. Філімоненко О.Ю., Конспект лекцій з дисципліни «Загальна біотехнологія», ДДТУ , 2016 : 9-16. [Електронний ресурс]. Режим доступу: ch0rome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-k118.pdf
25. Ramírez M, Velázquez R, López-Piñeiro A, Martínez A. Genome Features of a New Double-Stranded RNA Helper Virus (LBCbarr) from Wine *Torulaspora delbrueckii* Killer Strains. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13492. doi: 10.3390/ijms222413492.
26. Ramírez M, Velázquez R, Maqueda M, Martínez A. Genome Organization of a New Double-Stranded RNA LA Helper Virus From Wine *Torulaspora delbrueckii* Killer Yeast as Compared With Its *Saccharomyces* Counterparts. *Front Microbiol.* 2020;11:593846. doi: 10.3389/fmicb.2020.593846.
27. Ramírez M, Velázquez R, Maqueda M, Zamora E, López-Piñeiro A, Hernández LM. Influence of the dominance of must fermentation by *Torulaspora*

delbrueckii on the malolactic fermentation and organoleptic quality of red table wine. *Int J Food Microbiol.* 2016 ;238:311-319. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.029.

28. Velázquez R, Zamora E, Álvarez ML, Ramírez M. Using *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling wine. *Int J Food Microbiol.* 2019, 289:134-144. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.010.

29. Abu-Mejdad, N.M.J.A., Al-Badran, A.I. & Al-Saadoon, A.H. Purification and characterization of two killer toxins originated from *Torulaspora delbrueckii* (Lindner) and *Wickerhamomyces anomalus* (E.C.Hansen) Kurtzman, Robnett, and Basehoar-Powers. *Bull Natl Res Cent.* 2020, 44:48 <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00308-w>

30. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: Навч. посібник. К.НУХТ. 2022, 373 с.

31. Миючий засіб " САНІФЕКТ ". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-saniffekt-interdez-kiev>

32. Миючий засіб " САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ-САНАЦІЯ ". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/sanprof-universal-sanatsiia>

33. Миючий засіб " МАКСИСАН ". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/maksisan-unvcpd>

34. Миючий засіб " САНІМАКС ". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanimaks-interdez-kiev>

35. МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ, Наказ № 275, Інструкції із санітарно-протиепідемічного режиму аптечних закладів

36. СОП: «Підготовка приміщень класів чистоти D, C і B(A) виробництва стерильної продукції», СОП-05-08, ТОВ «*****».

37. СОП: «Порядок підготовки технологічного одягу та взуття для персоналу, працюючого в класі чистоти B, C, D та некласифікованих приміщеннях», СОП-05-01-02, ТОВ «*****».

38. Masneuf-Pomarede I, Bely M, Marullo P, Albertin W. The Genetics of Non-conventional Wine Yeasts: Current Knowledge and Future Challenges. *Front Microbiol.* 2016 Jan 11;6:1563. doi: 10.3389/fmicb.2015.01563.

39. M. N. Pons, H. Vivier, J. F. Rémy, J. A. Dodds . Morphological characterization of yeast by image analysis. *Biotechnology s bioengineering*. December 1993, Pages 1352-1359; <https://doi.org/10.1002/bit.260421112>
40. Mamun-Or-Rashid, A.N.M.; Lucy, T.T.; Pramanik, M.K. Isolation, Identification, Optimization of Baker's Yeast from Natural Sources, Scale-Up Production Using Molasses as a Cheap Carbohydrate Source, and Evaluation for Bread Production. *Appl. Microbiol.* 2022, 2, 516-533. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2030040>
41. Andrew R Boyd, Thusitha S Gunasekera, Paul V Attfield, Kristina Simic, Scott F Vincent, Duncan A Veal, A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery, *FEMS Yeast Research*, March 2003, Pages 11–16, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2003.tb00133.x>
42. El Khaled, D.; Castellano, N.N.; Gázquez, J.A.; Perea-Moreno, A.-J.; Manzano-Agugliaro, F. Dielectric Spectroscopy in Biomaterials: Agrophysics. *Materials* 2016, 9, 310. <https://doi.org/10.3390/ma9050310>
43. Azzolini M, Tosi E, Lorenzini M, Finato F, Zapparoli G. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015;31(2):277-93. doi: 10.1007/s11274-014-1774-1.
44. Lopes C.A. , Sangorrín M.P. Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev Argent Microbiol.* 2010, 42(4):298-306. doi: 10.1590/S0325-75412010000400011.
45. S, Rogaleva & Shkotova, Lyudmyla & V, L'vova & V, Garbuz & B, Muratov & I, Duda & O, Vasil'ev & Korpan, Yaroslav & Biloivan, Olga., Amperometric biosensor modified with multiwalled carbon nanotubes for glucose determination 2012. БІОТЕХНОЛОГІЯ. 5. 53-61. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.researchgate.net/publication/235559426_Amperometric_biosensor_modified_with_multiwalled_carbon_nanotubes_for_glucose_determination

46. Акименко Л.І. «Біотехнологія конструювання, виробництва та контролю якості ветеринарних препаратів та лікарських засобів». Ветеринарна біотехнологія 32(1), 2018 р.; УДК 636.09:615.375

47. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: основы лабораторных исследований : практикум / Ю. М. Краснопольский, Л. В. Северина ; Нац. техн. ун-т "Харьков. политехн. ин-т". – Харьков : НТУ "ХПИ", 2017. – 208 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://vo.uu.edu.ua/pluginfile.php/270932/mod_resource/content/1/%D0%A4%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B5%D0%B2%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F_%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F-%

48. СПБО, [Электронный ресурс]. Режим доступа; <https://promtehvod.kiev.ua/ua/p357660988-ustanovka-polnoj-biologicheskoy.html>

RESEARCH

Open Access



Purification and characterization of two killer toxins originated from *Torulasporea delbrueckii* (Lindner) and *Wickerhamomyces anomalus* (E.C.Hansen) Kurtzman, Robnett, and Basehoar-Powers

Najwa Mohammed Jameel Ali Abu-Mejdad^{1*}, Adnan I. Al-Badran¹ and Abdullah H. Al-Saadoon²

Abstract

Background: Ecological killer yeasts have had few studies compared with laboratory killer yeasts. The killer yeasts are known in excreting killer toxins that kill sensitive or susceptible yeasts. The killer toxins, such as TK and WK excreted from two yeast isolates (*Torulasporea delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus*) have *protenious* nature with different molecular weight depending on yeast species.

Results: A qualitative test was conducted to determine the ability of both isolates to produce killer toxins on the media of yeast extract and malt extract broth when the two toxins were first purified by ammonium sulfate salt at 40% concentration and then by dialysis for the killer toxin TK and gel filtration method for WK. The molecular weight of TK was estimated at about 15 kDa, while WK was at 45 kDa. The chemical properties of the killer toxins were also studied. The results showed that the two killer toxins were with *protenious* nature.

Conclusion: Both yeast isolates (*Torulasporea delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus*) had the ability of producing different kinds of killer toxins. The two killer toxins (TK and WK) were identified for the first time in Iraq, and their production involves many steps of economically unexpansive purification method with a good quality and high purity of producing killer toxins. The results confirmed that the nature of killer toxins (WK and TK) was similar to protein compounds resulted from the transition in UV and functional groups.

Keywords: Killer toxins, Protein, *Torulasporea delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*

Introduction

Killer yeasts are known in excreting killer toxins that kill sensitive or susceptible yeasts (Becker and Schmitt 2017). After the first report that indicated, the killer yeasts have antibacterial abilities, numerous antibacterial proteins initiating from yeasts have been recognized and considered as killer toxins. For instance, the Kx killer toxin secreted by *Saccharomyces cerevisiae* is protein

with molecular weight (45 KDa) (Melvydas et al. 2016). Also, the killer toxin excreted from *Candida krusei*, isolated from fermented vegetables, displayed growth inhibition against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*, and *Bacillus cereus* (Waema et al. 2009). Furthermore, *S. cerevisiae* has been reported having a killer activity against some bacterial strains (Valzano et al. 2016).

In addition to, Al-Qaysi et al. (Al-Qaysi et al. 2017) have recently demonstrated that the killer toxin originated from *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238 have an ability of killing several bacteria, such as *S. aureus*,

* Correspondence: najwajameel78@yahoo.com

¹Department of Biology, College of Science, University of Basrah, Basrah, Iraq
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons

E. coli, *Klebsiella pneumoniae*, and *Streptococcus pyogenes*. According to Liu et al. (Liu et al. 2015), Ascomycetous yeast species are particularly attractive targets producing killer toxins like proteins, because such organisms are known in producing a large variety of secondary metabolites and extracellular enzymes that have a medical importance as alternative drugs for bacterial resistant strains, especially MRD (multi resistance drugs). Regarding the characteristics required to conduct alcoholic fermentation in industry for the non-Saccharomyces yeasts such as *T. delbrueckii* and *W. anomalus* that are identical to the referent, best-deemed, *S. cerevisiae*. This is why *T. delbrueckii* and *W. anomalus* have been taken as the first non-Saccharomyces yeast suggested for industrial implementation in wine fermentation (Mauricio et al. 1998). However, small but pertinent dissimilarities in the physiological features of the two yeasts influence their option as selects for various industrial applications. In specific, the particular production range of killer toxin and raise alcoholic fermentation range by eliminated un coveted yeast by killer yeast that generated killer toxins to kill such yeast (Coda et al. 2011). As a result based on this background, the authors of this study were searching for killer toxins originated from ascomycetous yeasts in soil by using two type strains (*Torulasporea delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus*) as examined strains. Accordingly, the isolation, purification, and some properties of two killer toxins were described. The killer toxins produced by *T. delbrueckii* and *W. anomalus* were called TK and WK respectively.

Material and methods

Yeast strains

The killer yeast strains *Torulasporea delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus* were isolated from soil—Basrah (Abu-Alkhaseeb and Al-Qurna)—Iraq.

Culture media

Yeast malt extract broth (YMB) with 1% SDS: yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g, SDS 2 g, distilled water 1000 ml (Jorgensen et al. 2015); nutrient agar (Himedia, India) for antibacterial activity and activation of pathogenic bacteria, potato dextrose agar (Oxoid, UK) for the activation of yeast isolates.

Purification of killer toxins (TK, WK)

Fermentation medium

During this study, the best fermentation conditions were selected (medium of producing killer toxins), which is the medium of yeast malt extract broth (YMB) (Jorgensen et al. 2015) added to it is sodium dodecyl sulfate 0.2% (SDS) with the optimum conditions 30°C for 3-5 days and rotated at 150 rpm.

Protein purification

Precipitation with ammonium sulfate salt

The precipitation total protein with ammonium sulfate salts at the concentration of 40% weight/volume (saturation ratio) of the crude protein extracted from the best liquid fermentation culture filtrate for two isolates *Torulasporea delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus* after the elimination of the yeast cells by centrifugation at 6000 rpm/min for 20 min. Salt was added gradually with continuous stirring. After complete dissolving, the solution was left for an hour at 4°C. For the purpose of obtaining the crude protein, the solution was centrifuged with the high-speed centrifuge (10,000 rpm/min for 10 min) modify in time and number of round per minute of centrifuge (Taguchi 1995).

Dialysis

The crude protein precipitate which was weighed 4.1 g for *Torulasporea delbrueckii*, obtained from the above stage was dissolved with 125 mL of the buffer solution (citrate buffer), (pH = 4.4) for the dialysis process using special dialysis bags to this purpose using (3,10) KDa

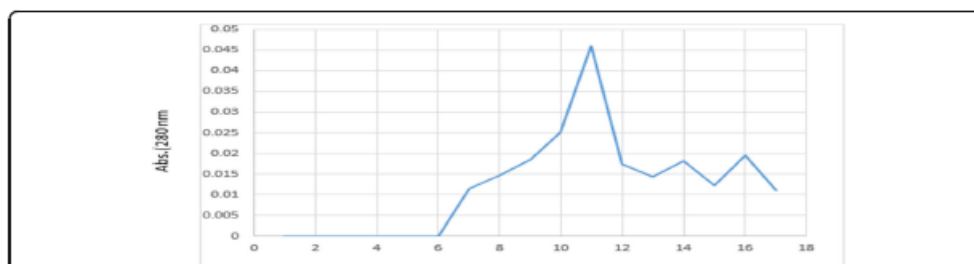


Table 1 Summary of the purification procedure of killer toxin from *Torulaspota delbrueckii*

Stage	Volume (ml)	Protein concentration (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Purification factor (fold)	Yield %
Culture supernatant	900	5	6	27,000	1	100
Ammonium sulfate precipitation	125	4.1	6.8	3500	1.133	12.9
Dialysis	134	0.04	750	4020	110	14.8

dialysis bags. The process of dialysis was done at 4 °C for 48 h with dialysis solution (distilled water) changed almost every 12 h. The size of the protein extract was estimated with milliliter, and its protein concentration was estimated, then lyophilization is the purified protein, preserved it for biological activity.

Note: The purify of the protein was checked by using vertical electrophoresis SDS-PAGE. Purification of killer toxins from *Wickerhamomyces anomalus* by sephadex G-LH 20 (Villalba et al. 2016).

Fractionation of protein extract on G-20 sephadex

The gel chromatography was used for purification of protein extract into molecular size according to the method of Taguchi (1995) with modification as follows:

- Sephadex G-20 2 g dry weight was activated in about 50 ml of ice methanol for 15 min to provide gel for a (1 × 15) cm column.
- Sodium azide was added to column (NaN₃) to prevent contamination; the gel was left after pouring in the column for 18 h to the purpose of stabilization and stacking, and then wash the gel by methanol.
- Void volume (V_o) using the blue Dextran 2000 KDa dye at 0.01 g/ml concentration.

Measuring of protein concentration in purified killer toxin

The protein concentration of purified killer toxin was measured after pooling the tubes that form each peak together, the measurement was carried out using Lowry method. The Lowry protein assay is a biochemical test for defining the level of total protein in a solution. The concentration of total protein is displayed by the changes of sample solution color in ratio to the concentration of protein concentration that can be calculated using colorimetric techniques with using bovine serum albumin (BSA) as

a standard protein with graduate concentrations (100 to 1000 µg/ml) (Lowery et al. 1951).

Polyacrylamide gel electrophoresis

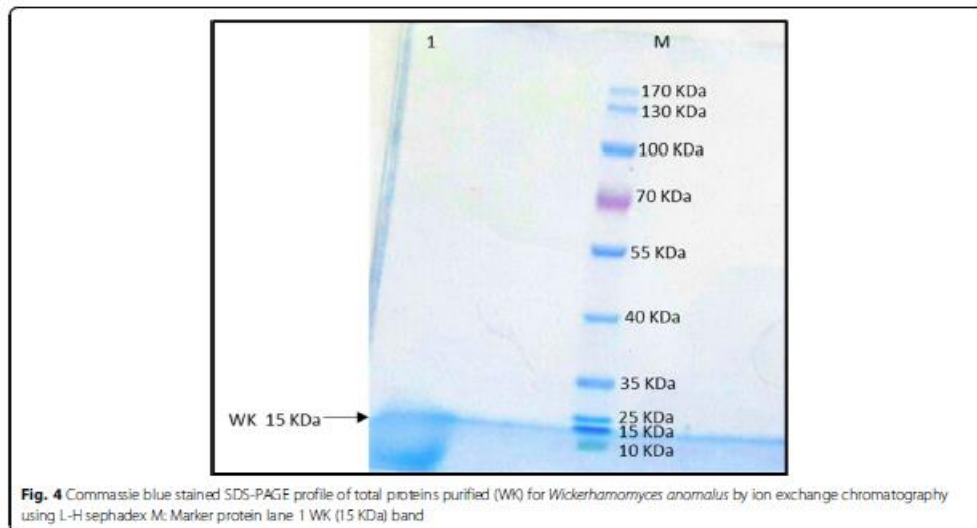
The procedure according to the principle of (Laemmli 1970), SDS-PAGE depends on the separation of proteins and their molecular weight. In the present study, 12% resolving gel was made for analysis, (0.025 M Tris, 0.25 M glycine, 0.1% SDS) for 1× tank buffer for SDS-PAGE. The protein samples to be analyzed were loaded into the wells formed in the resolving gel with a fine tip. The samples were electrophoresed for 60 min at 80 volts then the voltage was increased to 100 volts for another 60 min. Coomassie blue was used for staining polyacrylamide gels after electrophoresis to visualize the resolved protein bands, destain solution is prepared as follows: methanol 10 ml, glacial acetic acid 10 ml, D.W. 80 ml.

Biological activity of purified killer toxins extracted as antifungal

The susceptibility test of the purified toxins was performed as described in (Al-Hilfy and Abu-Mejdad 2014), A 100 µl from the suspension of *Candida albicans* which obtained it from Al-Zubair Hospital, patient suffering from cutaneous candidiasis and identifying it by ITS1-5.8rRNA-ITS2 in mycological lab, then added suspension of yeast to the Sabourauds agar, spread it by L-shaped glass spreader. The plates were left to dry for 15 min at room temperature and then wells with 6 mm diameter were made using cork-borer. After that, a 100 µl of killer toxins (TK, WK) at concentration of 200 mg/ml, DW were added individually to each well and incubated at 37 °C for 24 h. The results were read by measuring the inhibition zone diameter in millimeter.

Table 2 Summary of the purification procedure of killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus*

Stage	Volume (ml)	Protein concentration (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Purification factor (fold)	Yield %
Culture supernatant	900	5.3	66	31,500	1	100



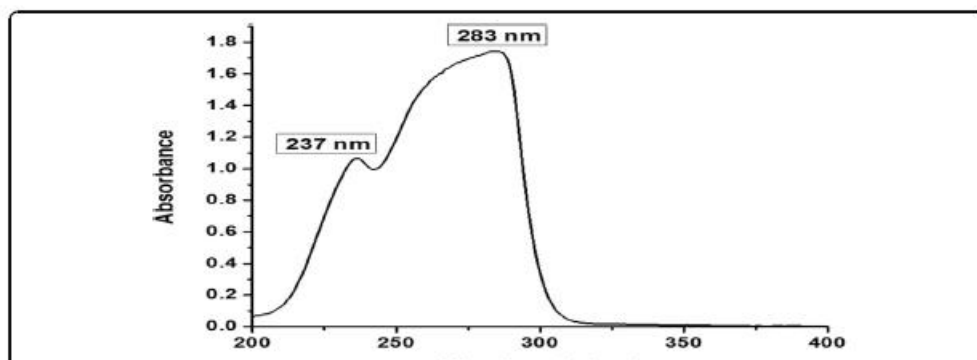
clarified the concentration and amount of TK was more than WK after purification of each them individually.

SDS-PAGE

The results of the analysis of purified proteins on SDS-PAGE 12 % were shown sharp bands (WK) for *Wickerhamomyces anomalus* at 15 KDa (expected size) compared with Ladder. Figure 3 and the results shown (TK) for *Torulasporea delbrueckii* presence of ~ 45 KDa (expected size) band compared with Ladder (Fig. 4).

UV absorption spectroscopy of TK and WK killer toxins

Figures 5 and 6 show the UV absorption spectra in distilled water. One strong absorption bands at lower wavelengths appeared 237 nm for TK UV, while two strong absorption bands at lower wavelengths appeared within 229-264 nm for WK UV. These absorption bands correspond to $\pi-\pi^*$ transitions that appear due to groups like O-H and N-H. At longer wavelengths, the absorption spectra showed weak third bands within 283 in TK UV , 317 nm in WK UV which could be correlated to $n-\pi^*$ transitions that appear due to groups like O-H and N-H.



Kluyveromyces phaffii killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization

Francesca Comitini, Natalia Di Pietro, Laura Zacchi, Ilaria Mannazzu and Maurizio Ciani

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

Correspondence
Maurizio Ciani
mciani@univpm.it

Received 8 March 2004
Revised 29 April 2004
Accepted 20 May 2004

The killer toxin secreted by *Kluyveromyces phaffii* (KpKt) is active against spoilage yeast under winemaking conditions and thus has potential applications in the biocontrol of undesired micro-organisms in the wine industry. Biochemical characterization and N-terminal sequencing of the purified toxin show that KpKt is a glycosylated protein with a molecular mass of 33 kDa. Moreover, it shows 93% and 80% identity to a β -1,3-glucanase of *Saccharomyces cerevisiae* and a β -1,3-glucan transferase of *Candida albicans*, respectively, and it is active on laminarin and glucan, thus showing a β -glucanase activity. Competitive inhibition of killer activity by cell-wall polysaccharides suggests that glucan (β -1,3 and β -1,6 branched glucans) represents the first receptor site of the toxin on the envelope of the sensitive target. Flow cytometry analysis of the sensitive target after treatment with KpKt and K1 toxin of *S. cerevisiae*, known to cause loss of cell viability via formation of pores in the cell membrane, suggests a different mode of action for KpKt.

INTRODUCTION

Killer toxins were first discovered in *Saccharomyces cerevisiae* by Makower & Bevan (1963) and they have since been found in numerous other yeast genera (Philliskirk & Young, 1975; Stumm *et al.*, 1977; Rosini, 1983, 1985; Starmer *et al.*, 1987). Through the following years, killer yeasts and their toxins found applications in several fields. For example, killer yeasts have provided an interesting model for studying the mechanisms involved in the processing and secretion of extracellular proteins, and the identification of killer toxin receptors on the envelope of sensitive targets has helped in the elucidation of the structure and function of the yeast cell wall. Killer yeasts have been used to combat contaminating wild yeasts in the food and fermentation industries, and to control wood-decay basidiomycetes and plant-pathogenic fungi (Young, 1987; Boone *et al.*, 1990; Palpacelli *et al.*, 1991; van Vuuren & Jacobs, 1992; Walker *et al.*, 1995). In the medical field, these yeasts have been used in the biotyping of pathogenic yeasts and yeast-like fungi (Morace *et al.*, 1989; Boeckhout & Scorzetti, 1997; Buzzini & Martini, 2001), and in the development of novel antimycotics for the treatment of human and animal fungal infections (Hodgson *et al.*, 1995; Seguy *et al.*, 1998; Conti *et al.*, 2002; Schmitt & Breinig, 2002).

Abbreviations: aU, arbitrary units; KpKt, *K. phaffii* killer toxin; PI, propidium iodide.

Recently, it has been shown that *Kluyveromyces phaffii* (since reclassified as *Tetrapispora phaffii*) (Ueda-Nishimura & Mikata, 1999) produces a killer toxin (KpKt) that is active on wine-spoilage yeasts (Ciani & Fatichenti, 2001). KpKt has an extensive anti-*Hanseniaspora/Kloeckera* activity under winemaking conditions and, therefore, is of particular interest for its potential application as an antimicrobial agent in the wine industry (Ciani & Fatichenti, 2001). At present, the inhibition of wild spoilage yeast at the pre-fermentative stage is achieved by the addition of SO₂ to freshly pressed must. This antiseptic agent, which has been shown to have a toxic action on humans, is also re-added at the end of fermentation for its antioxidant properties. The use of KpKt as a substitute for SO₂ during the pre-fermentative stage would limit SO₂ use to only the post-fermentative stage, thus reducing the total amount of this antimicrobial in the final product. Moreover, as KpKt is also active against yeasts belonging to the species *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxi*, the possible use of this toxin for the control of spoilage yeasts in sweet beverages may also be promising (Palpacelli *et al.*, 1991).

In order to gain information on the nature and mode of action of KpKt in view of its possible use in the wine and beverage industries, the purpose of this study was the characterization of this *K. phaffii* killer toxin. The active protein was purified and assayed for its molecular mass, glycosylation and enzymic activity. The KpKt NH₂-terminal

sequencing, primary binding sites within the cell wall of sensitive yeasts, and mode of action were also investigated.

METHODS

Micro-organisms and media. The following strains, belonging to the Industrial Yeast Collection of the University of Perugia (DBVPG), were used: DBVPG 6076, the *K. phaffii* killer strain; DBVPG 6497, the *S. cerevisiae* strain with K1 killer activity; DBVPG 6500, a sensitive *S. cerevisiae* strain; and DBVPG 3037, a KpKt-sensitive strain of *Hanseniaspora uvarum*. The yeast strains were sub-cultured at 6-month intervals on malt agar and maintained at 6 °C. The media used included: malt agar (Difco), YPD [1% Bacto yeast extract, 1% Bacto peptone, 2% (w/v) glucose] and a synthetic medium (SM) [0.67% Yeast Nitrogen Base (Difco), 2% (w/v) glucose]. All media were buffered at pH 4.5 with 100 mM citrate/phosphate buffer. Agar (Difco) was added when needed (1.8%).

Killer activity assay and measurement. KpKt activity was determined according to Somers & Bevan (1969). Briefly, 70 µl toxin samples were filter-sterilized through 0.45 µm pore-size membrane filters (Millipore) and put into wells (7 mm diameter) cut in the malt agar plates that had previously been seeded with 10^5 cells ml⁻¹ of a sensitive indicator strain. The killing activity was measured as the diameter of the inhibition halo around the well after incubation for 72 h at 20 °C, and is defined as the mean zone of inhibition of replicate wells. The linear relationship observed between the logarithm of killer toxin concentration and the diameter of the inhibition halo assayed by this well-test method was used to define KpKt activity in arbitrary units (aU). One aU is defined as the toxin concentration that results in an inhibition halo of 15 mm (actual diameter 8 mm, considering the 7 mm diameter of the well) (Ciani & Faticenti, 2001). One aU corresponds to about 1.0 µg killer protein.

KpKt production. *K. phaffii* (DBVPG 6076) was cultivated in SM in a 2 l bench-top fermenter (Biostat C, B. Braun Biotech) with a 1.8 l working volume. The oxygen concentration was maintained at 20% by automatically regulating the stirrer. The temperature was maintained at 25 °C. After 40 h, the culture was centrifuged (5000 g for 10 min, 4 °C) and the supernatant was filter-sterilized through 0.45 µm pore-size membrane filters (Millipore).

Purification of KpKt. The filter-sterilized supernatant was concentrated with Amicon YM10 (10 kDa cut-off membrane; Pharmacia) to a final volume of 12 ml, which was then dialysed with 10 mM citrate/phosphate buffer, pH 4.5, using dialysis membrane (12–14 kDa, Mediatech), and applied to a pre-equilibrated (10 mM citrate/phosphate buffer, pH 4.5) Q-Sepharose Fast Flow IEX column (50 ml bed volume; 3 ml min⁻¹ flow rate; Amersham Biosciences). After application of the sample (34 mg protein in 12 ml) to the column, the bound protein was eluted with the following step-wise increases in the NaCl concentration in the elution buffer (10 mM citrate/phosphate, pH 4.5): 0, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500 mM.

Electrophoresis and mass spectrometry. SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970). The protein was stained with Coomassie blue R-250 (Sigma) and the molecular mass determined by comparison with known marker proteins (Pre-stained Protein Ladder, MBI Fermentas LMW-SDS, Pharmacia Biotech). The molecular mass of the purified killer toxin was confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS; Waters Corp.), using the following modalities: instrument, TofSpec-E; source voltage, 20 000 V; mode, linear; ionization mode, LD+. The mass accuracy and precision of the technique are consistently within 0.04%.

Endoglycosidase H treatment of KpKt. KpKt was treated with

assay was performed following the procedure described by Elgersma *et al.* (1997). In brief, 5 µl endoglycosidase H (0.01 IU µl⁻¹) was added to 25 µl KpKt (25 aU) and 70 µl buffer (150 mM sodium citrate, pH 5.5, 1 mM PMSF, 10 µM pepstatin, 5 mM sodium azide, 643 µl H₂O). Samples were incubated at 37 °C for 48 h, with gentle agitation, and subjected to SDS-PAGE, as described above.

NH₂-terminal amino acid sequencing. After electrophoresis, the purified KpKt was transferred to a PVDF membrane and stained with Coomassie blue, as described by Steinberg *et al.* (2001). The relevant band was cut out and subjected to 15 cycles of sequence analysis in a protein sequencer (Applied Biosystems).

Enzymic activity. β-Glucanase activity was determined as described by Notario (1982) by using as enzymic substrates laminarin and glucan. The units of β-glucanase activity are defined as µmol glucose liberated per mg protein per min. Glucose was determined by using the enzymic kit no. 716251 (Boehringer Mannheim). Laminarinase (Sigma-Aldrich) was used as positive control of enzymic activity.

Binding of KpKt by cell-wall polysaccharides. The sensitive *H. uvarum* strain (DBVPG 3037; 10^5 cells ml⁻¹) was treated with the killer toxin (70 aU ml⁻¹) in the absence or presence of 9 mg ml⁻¹ of the following cell-wall polysaccharides: laminarin (Sigma), mannan (Sigma), glucan (Sigma) and pustulan (Calbiochem). After an incubation at 25 °C for 24 h, the cell samples were subjected to viable cell counts to assess the binding activities of the polysaccharides.

Evaluation of KpKt mode of action. The sensitive strains (10^6 cells ml⁻¹) were incubated with 46 aU killer toxins (KpKt and K1) at 25 °C in a final volume of 1.5 ml. At each sampling time, 100 µl cell suspension was pelleted by centrifugation (2 min at 400 g), resuspended in 500 µl PBS buffer (8 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) to which 50 µl propidium iodide (PI) solution (1 mg ml⁻¹, in the same buffer) was added, and finally processed on a Coulter Epics XL (Beckman Coulter). Forward scatter (FS) and side scatter (SS) were recorded using a linear scale. The intensity of fluorescence at FL3 (red fluorescence, 620 nm) was measured on a logarithmic scale and displayed in a single-parameter histogram. At the time defined for the flow cytometry assay, aliquots of the cell suspensions were subjected to a viable plate count in triplicate in YPD agar plates. The plates were incubated for a minimum of 48 h at 25 °C, the colonies were counted, and the results were expressed as percentage reduction in c.f.u. ml⁻¹.

RESULTS

Production and purification of KpKt

Previous studies have shown that KpKt production is enhanced by the presence of yeast extract and organic nitrogen compounds in the growth medium (Rosini & Palpacelli, 1988). However, to avoid high-molecular-mass compounds in the supernatant and to facilitate the purification of the killer protein, in the present study SM was used for DBVPG 6076 growth and KpKt production in a bench-top fermenter. As expected, the use of SM resulted in a limited amount of total protein and a low KpKt activity in the culture broth (Table 1). Therefore, the killer toxin was concentrated 130-fold by ultrafiltration before purification on a Q-Sepharose Fast Flow anion-exchange column. The fraction containing KpKt was eluted with 125 mM NaCl in

Table 1. Purification of KpKt from *K. phaffii*

Purification procedures are described in Methods; 1 aU is defined as the toxin concentration that causes a clear zone of 8.0 mm around the well.

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (aU ml ⁻¹)	Total activity (aU)	Specific activity (aU mg ⁻¹)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture broth	1800	144	0.3	540	3.8	1	100
Ultrafiltration	12	34	31	372	10.9	2.9	69
Q-Sepharose	1.2	0.06	54	65	1083	285	12

of the purified protein increased by 285-fold and 12 % of the killer protein was recovered (Table 1).

SDS-PAGE of the sample collected after these purification procedures showed a single protein band with an apparent molecular mass of 33 kDa (Fig. 1). The purity and molecular mass of KpKt were confirmed by mass spectrometry, which showed the presence of a main peak of 33.07 kDa (not shown).

Properties of KpKt

Treatment of the purified KpKt protein with endoglycosidase H led to a slight reduction in the molecular mass of KpKt, with estimated mass of carbohydrate of about 10 % of total molecular mass of killer protein as shown in Fig. 2. Thus, as with other known killer proteins, KpKt is glycosylated.

With the aim of identifying the first receptor site of KpKt on the envelope of sensitive cells, the competitive inhibition of

killer toxin action by cell-wall polysaccharides was investigated using mannan, laminarin (mainly β -1,3-, with a few β -1,6-linked glucans), pustulan (β -1,6-glucan) and glucan (β -1,3- and β -1,6-branched glucans). The results show that only glucan was able to competitively inhibit KpKt killing action and enhance cell survival (Fig. 3). In contrast, mannan, laminarin and pustulan could not rescue the cells, possibly due to their inability to bind KpKt (Fig. 3).

N-terminal sequencing and enzymic activity of KpKt

Purified KpKt was blotted onto PVDF membrane and subjected to NH₂-terminal sequencing for the elucidation of the nature of this protein. A BLAST analysis of the 15 amino acid sequences obtained failed to detect significant homologies with any known killer toxins in protein databases. However, the NH₂-terminal region of KpKt shows 93 % identity and 100 % similarity to a β -1,3-glucanase of *S. cerevisiae*, and 80 % identity and 100 % similarity to a

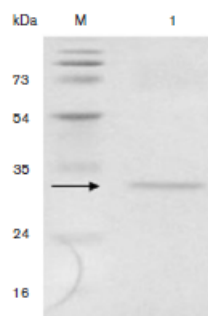


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified KpKt killer toxin. The fraction eluted at 125 mM NaCl and containing the killer toxin activity was analysed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. M, prestained molecular mass markers (MBI Fermentas); arrow, purified killer protein.

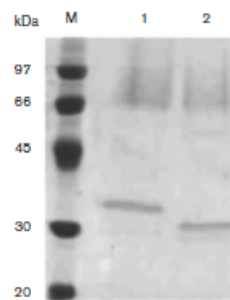


Fig. 2. Endoglycosidase treatment of KpKt. A 25 aU sample of purified KpKt was treated with 0.05 IU endoglycosidase H, incubated for 48 h at 37 °C with gentle agitation, and analysed by SDS-PAGE against a negative control (untreated KpKt). M, molecular mass markers (LMW-SDS, Pharmacia, Biotech). Lanes 1 and 2 contain killer toxin untreated and treated with endoglycosidase H, respectively.

TABLE 3. Effect of papain on Kpkt^a activity^b

Time (h)	CFU (10 ⁶ ml ⁻¹)		
	Control		Killer toxin and papain
	No killer toxin	Killer toxin	
0	0.3	0.2	0.4
24	58.0	0.2	18.0

^a Toxin concentration, 14.3 AU ml⁻¹.^b The diameters of the zones of inhibition (measured in the well test assay) for *S. cerevisiae* were as follows: without killer toxin, 0.0 mm; with killer toxin, 8.5 mm; and with killer toxin and papain, 0.0 mm. The diameters of the zones of inhibition (measured in the well test assay) for *H. uvarum* were as follows: without killer toxin, 0.0 mm; with killer toxin, 4.5 mm; and with killer toxin and papain, 0.0 mm.

tive *H. uvarum* strain. The killer activity observed for both sensitive strains was completely lost at pH 6. At pH 2.8 the toxin showed reduced activity against *S. cerevisiae*, whereas no activity was observed against *H. uvarum*. Regarding the influence of temperature, the killer activity was stable up to 25°C (Fig. 1B), whereas higher temperatures caused a progressive decrease of the activity of Kpkt. No activity was found after 2 h of incubation at 40°C. Heat treatment (100°C for 10 min) caused loss of activity. These results were confirmed by a viable-cell count assay (data not shown).

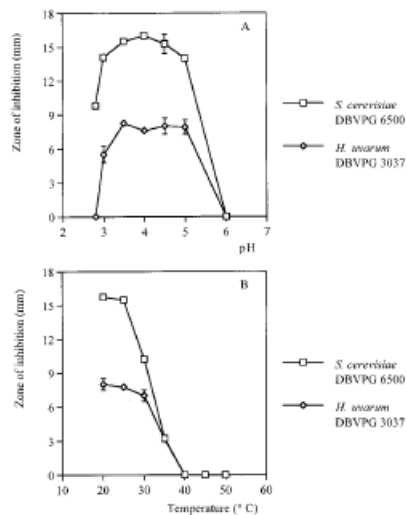


FIG. 1. Effects of pH (A) and temperature (B) on the activity of Kpkt. pH effects were evaluated by the well test assay. Malt agar was buffered from pH 2.8 to 6.0 10 mM citrate-phosphate buffer. The toxin concentration was 14.3 AU ml⁻¹. After 2 h of incubation at various temperatures, the killer activity was evaluated by the well test assay (pH 4.5). The toxin concentration was 14.3 AU ml⁻¹. Data are given as means ± standard deviations of at least duplicate experiments.

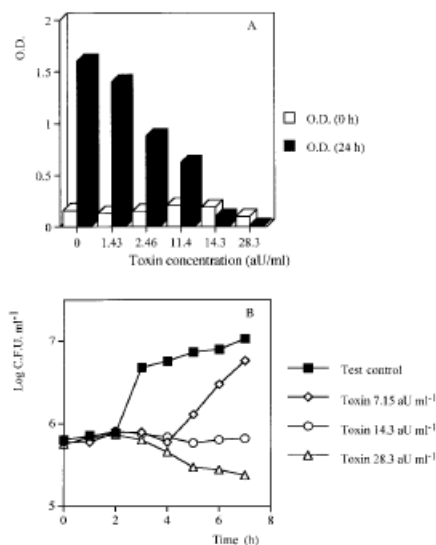


FIG. 2. Fungistatic and fungicidal activity of Kpkt evaluated by OD unit (A) and log CFU ml⁻¹ (B). Cells were grown in YPD broth buffered at pH 4.5. The initial inoculum contained 10⁸ *H. uvarum* cells ml⁻¹. Each sampling point represents the mean of duplicate experiments. The variation was less than 10%.

Mode of action of Kpkt against *H. uvarum* DBVPG 3037.

The effects of Kpkt on *H. uvarum* DBVPG 3037 growth were tested in liquid media at different concentrations of the killer factor. The growth of *H. uvarum* (assayed by measuring the OD₅₈₀ after 24 h of incubation at 20°C) showed a progressive reduction with increased toxin concentrations. Interestingly, at the toxin concentration corresponding to 14.3 AU in the supernatant (Fig. 2A), no growth was observed. In another trial, the evaluation of the viable cells during the first 8 h of growth confirmed that the critical concentration necessary for a fungicidal effect was 14.3 AU (Fig. 2B). Lower concentrations appeared fungistatic for *H. uvarum*, extending lag phase for 2 h before growth resumed.

In order to assess the modality of action of Kpkt, the growth rate reduction assay (25) was carried out. The plotting of increased concentrations of the killer toxin against the growth rate (Fig. 3) showed an exponential relationship with typical saturation kinetics.

Activity of Kpkt in grape juice. In order to verify the potential of DBVPG 6076 as a biological antiyeast agent in wine making, DBVPG 6076 toxin activity was assayed in natural grape juice. Moreover, the activities of Kpkt and SO₂, the chemical antiseptic agent universally used in winemaking, were compared. Figure 4 shows the development of viable *H. uva-*

Isolation and Characterization of the K5-Type Yeast Killer Protein and Its Homology with an Exo- β -1,3-glucanase

Fatih İZGÜ† and Demet ALTINBAY

Department of Biological Sciences, Middle East Technical University, 06531, Ankara, Turkey

Received October 23, 2003; Accepted December 8, 2003

K5-type yeast killer protein in the culture supernatant of *Pichia anomala* NCYC 434 cells was concentrated by ultrafiltration and purified to homogeneity by ion-exchange chromatography with a POROS HQ/M column followed by gel filtration with a TSK G2000SW column. The protein migrated as a single band on discontinuous gradient SDS-PAGE and had a molecular mass of 49000 Da. The pI value of the K5-type killer protein was measured at pH 3.7 by high voltage vertical gel electrofocusing. The result of an enzyme immuno assay revealed that it was a glycosylated protein. Its internal amino acid sequencing yielded the sequences LNDFWQQGYHNL, IPIGYWAFQLLDNDPY, and YGSDYGDVVGIEEL, which are 100% identical to exo- β -1,3-glucanase (accession no. AJ222862) of *Pichia anomala* (strain K). The purified protein was highly stable at pH values between 3 and 5.5 and temperatures up to 37°C.

Key words: killer yeast; *Pichia anomala*; K5 type killer protein; exo- β -1,3-glucanase

The killer phenotype, which was first discovered by Bevan and Makower¹⁾ in *Saccharomyces cerevisiae*, is widely distributed among yeast.²⁻⁴⁾ Yeast strains with killer phenotype (K⁺) produce and excrete into the environment proteins or glycoproteins that are lethal to sensitive microbial cells.^{5,6)} Thus these proteins are designated as killer proteins or killer toxins.^{7,8)} Young & Yagiu⁹⁾ have investigated the killer strains of the genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, and *Pichia*, and on the basis of killing and immunity cross-reactions among them classified the killers into ten typical (K1-K10) types to which another type (K11) was added later.¹⁰⁾ In recent years several new killer yeast strains have been reported and their toxins characterized but they are not yet classified according to the above criteria.¹¹⁻¹⁸⁾

The genomes of the toxins have been mapped either on extra-chromosomal elements in the form of double-stranded RNA virus-like particles^{3,19,20)} or double-stranded linear DNA plasmids^{21,22)} or a chromosome.^{15,23)} Killer toxins also have different killing

mechanisms on sensitive cells. They disrupt cytoplasmic membrane function by ion channel formation²⁴⁾ or interfere with cell wall synthesis by inhibiting β -1,3-glucan synthase.²⁵⁾ In some cases toxin blocks both the DNA synthesis and the budding cycle²⁶⁾ or arrest cell division at G1 phase.²⁷⁾

Killer toxin production confers an advantage on strains in competing with sensitive cells for nutrients available in their environment.⁴⁾ Various potential applications have been studied and suggested for killer yeasts and their toxins. They can be used to eliminate undesirable contaminating yeasts during fermentations by conferring the killer character on starter strains²⁸⁻³⁰⁾ and can be considered as bio-control agents in the preservation of foods.³¹⁾ In the medical field, the killer character can be a useful means of bio-typing the pathogenic yeasts³²⁾ and bacteria³³⁾ and the killer toxins have been suggested as potential antimicrobial agents in the treatment of infections.^{34,35)} Although there is considerable amount of published information concerning the applications of yeast killer toxins, among the 11 typical types, only K1,⁷⁾ K2³⁶⁾ and K6³⁷⁾ have been characterized. Herein we describe the purification and characterization of the K5 type yeast killer protein produced by the standard K5 killer type strain of *Pichia anomala*.^{11,38)}

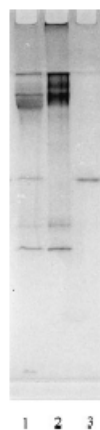
Materials and Methods

Yeast strains and culture media. *Pichia anomala* from the National Collection of Yeast Cultures, UK (NCYC 434, K5) was used as the source of K5 type killer protein and *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 was used as the killer-toxin-sensitive strain. **Strains were routinely maintained on YEPD agar, comprising 1% (w/v) Bacto-yeast extract (Difco), 2% (w/v) Bacto-peptone (Difco), 2% (w/v) dextrose (Merck), and 2% (w/v) Bacto-agar (Difco) at pH 5.5. For killer-activity determination it was buffered to pH 3.0-6.0 at intervals of 0.5 pH units with 100 mM citrate-phosphate buffer. *P. anomala* cells in liquid culture were grown either in YEPD or YNBG comprising 0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and 2% (w/v) glucose (Merck).**

† To whom correspondence should be addressed. Tel: +90-312-2103177; Fax: +90-312-2101289; E-mail: izgu@metu.edu.tr

Table 1. Purification of K5 Type Yeast Killer Toxin

Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Protein (mg)	Activity of killer toxin (U)	Activity of killer toxin (U/mg)	Total purification (Fold)	Total recovery (%)
Cell-free culture liquid	1000	12.8	12800	6400	0.5	1.0	100
Concentrated culture liquid	20	71	1420	5112	3.6	7.2	80
POROS HQ/M	6	4.6	28	3920	140	280	61
TSK G2000SW	6	1	6	1200	200	400	19

Fig. 3. Native Protein Profiles of *P. anomala* NCYC 434 (K5) Culture Supernatants.

Extracellular proteins (15 μ g) prepared from YEPD (lane 1) and YNBG (lane 2) liquid cultures along with purified K5 type killer protein (2 μ g) (lane 3) were run on a 15% native polyacrylamide gel.

the purification steps is shown in Table 1. Subsequently native-PAGE profiles of extracellular proteins of YEPD and YNBG media were compared. Absence of a single band in the extract of YNBG, adjacent to the isolated protein, further confirmed the presence of a single type of killer protein in the culture medium and its purity (Fig. 3).

Characterization of the purified toxin

Molecular mass

On a discontinuous gradient SDS-PAGE with a wide range molecular mass markers the toxin moved in a single band in front of glutamate dehydrogenase (55,562 Da). The molecular mass of the toxin was estimated to be 49,000 Da (Fig. 4).

Isoelectric point

On a pH 3–10 gradient native polyacrylamide gel with broad range pI markers the toxin focused between

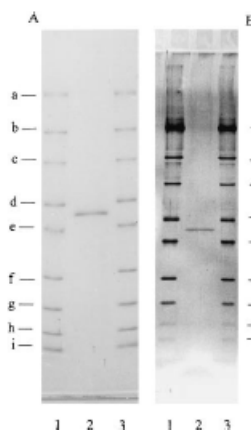


Fig. 4. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (5–20% gradient) of K5 Type Yeast Killer Protein.

(A) Coomassie blue and (B) Silver stained gels. Lanes 1 and 3 are molecular mass markers (Da); (a) α_2 macroglobulin 170,000; (b) β galactosidase 116,353; (c) fructose 6-phosphate kinase 85,204; (d) glutamate dehydrogenase 55,562; (e) aldolase 39,212; (f) triose phosphate isomerase 26,626; (g) trypsin-inhibitor 20,100; (h) lysozyme 14,307; (i) aprotinin 6,500. Lane 2 is K5-type yeast killer protein (2 μ g).

soya bean trypsin inhibitor (pI 4.55) and amyloglucosidase (pI 3.5). A pI value of 3.7 was decided for the toxin (Fig. 5).

Glycosylation

The result of the enzyme-immuno assay revealed that the toxin was a glycosylated protein since there was a positive signal on the membrane in the position corresponding to the toxin (Fig. 6).

Internal amino acid sequences

Tryptic peptides of the purified toxin were separated by reversed phase HPLC and the fractions 44 and 81 (Fig. 7) were collected and applied to an amino acid sequencer. Fraction 44 gave a sequence of LNDFWQQGYHNL and fraction 81 revealed two peptide sequences of IPIGYWAFQLLDNDPY and YGSDYGDVIGIELL. These internal amino acid sequences shared 100% homology with *exo- β -1,3-*

(Lopes and Sangorrín, 2010; Sangorrín et al., 2008). The killer capacity of *T. delbrueckii* was reported for the first time in a previous work from our laboratory (Sangorrín et al., 2007) but only some ecological aspects of this capacity have been evaluated until now (Lopes and Sangorrín, 2010). Because *T. delbrueckii* is ethanol-tolerant wine yeast detected in advanced stages of wine fermentations in North-Patagonia and other wine-regions worldwide (Ciani and Maccarelli, 1998; Renauld et al., 2009), the killer toxins produced by this species could be interesting for wine spoilage yeast biocontrol.

This paper focuses on the characterization of a killer toxin of *T. delbrueckii*, its biochemical properties and its ability to biocontrol different wine spoilage species. Crude extracts of the selected killer toxin were used to evaluate the stability of TdKT in oenological conditions and its putative mode of action, on sensitive strains.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and media

Eighteen *T. delbrueckii* killer yeast strains from North Patagonia, the type strains of *T. delbrueckii* NRRL Y-866 and the sensitive reference strain *Candida glabrata* NCYC 388 were used for killer assays. A total of 12 strains of *Brettanomyces bruxellensis* (NRRL Y-411, CECT 2113, INTA VC20), *Pichia manshurica* (NPCC 1038), *P. membranifaciens* (NRRL Y-2026, INTA K21, USACH 3000, NPCC 1099) and *P. guilliermondii* (NRRL Y-075, NPCC 1055, USACH 3008, NPCC 1070) from different origins were used as representatives of wine spoilage yeasts. The yeasts were maintained in the GPY-agar medium (20 g/L glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract and 20 g/L agar, pH 6.0). In the case of *B. bruxellensis* strains, the medium was supplemented with 5 g/L of calcium carbonate. All strains were maintained in the North Patagonian Culture Collection (NPCC, Neuquén, Argentina). Six commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast starters habitually used in North Patagonian wineries from different supplier companies were also used.

2.2. Killer toxin activity assays

2.2.1. Qualitative method (QLM)

The killer sensitivity evaluation was performed following the procedure described by Lopes and Sangorrín (2010). The lawn yeast was designated as sensitive when a clear zone of inhibition generally fringed with blue colour was observed surrounding the killer yeast streak after incubation for 48 h at 20 °C. Assays were performed in duplicate.

2.2.2. Quantitative methods

2.2.2.1. Well test method (WTM). Killer activity of the crude extracts (Section 2.3) was determined against *C. glabrata* NCYC 388 according to De Ingeniis et al. (2009) with modifications. The killer activity was evaluated as the diameter of the inhibition halo (3–5 mm) around the well after incubation for 48 h at 20 °C, and it was defined as the mean of two replicate wells.

2.2.2.2. Multiwell method (MWM). Killer activity of crude extracts (Section 2.3) was determined against *C. glabrata* NCYC 388 according to Guyard et al. (2002) with modifications. One unit of killer activity (KU) was defined as the volume of toxin extract necessary to inhibit 50% of the sensitive reference strain growth after 48 h of incubation at 20 °C. Assays were performed in quadruplicate.

2.3. Production of killer toxin extracts

Cultures were performed in 2 L Erlenmeyer flasks containing 1 L YEPD broth incubated at 20 °C. Growth was evaluated by measuring the OD₆₄₀. The production of killer toxins was monitored during the batch cultivation of the producing strain by means of the multiwell

method (MWM), aliquots of 30 mL of the cultures were collected daily and used for crude extract preparation. Once cultures reached the stationary phase, cells were removed by centrifugation at 5000 ×g for 10 min at 4 °C. The protein mix containing TdKT was obtained by precipitation of culture supernatant with 80% w/v ammonium sulphate and centrifugation at 7000 ×g. The pellet obtained was resuspended in a 100 mM citrate–phosphate buffer pH 4.5, dialyzed overnight in the same buffer and threefold concentrated with sugar in dialyzing tubing (cut off 2 kDa). This concentrated supernatant was used as the crude killer toxin extracts. Aliquots of concentrated supernatants containing 20% v/v glycerol were filter-sterilized through 0.22 μm pore-size membrane filters (Millipore) and stored at –20 °C until their use for killer activity detection.

2.4. Killer toxin characterization

2.4.1. Molecular weight estimation

Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore, Billerica, MA, US) with cut-off at 3, 10 and 30 kDa were used to separate proteins from the crude extract preparation according to the recommended conditions of the supplier. The killer activity concentrated 10-fold by ultrafiltration flow-through of each different cut-off was tested in WIM assays against *C. glabrata* NCYC 388.

2.4.2. Effect of oenological parameters on killer toxin stability

The stability of the toxin was examined by testing the residual killer activity after 2 h incubation in each different condition. We tested the effect of different values of temperature (8, 15, 20, 26, 37, 50 °C), pH (3, 3.2, 3.6, 3.8, 4.4, 5, 6), ethanol concentration (0, 3, 6, 9, 12, 14, 16% v/v), glucose concentration (0, 10, 20, 210, 240, 280 g/L) and free SO₂ concentration (0, 25, 50, 75, 100, 150 ppm) employing the MWM against *C. glabrata* NCYC 388. YEPD was used as the general medium and different pH conditions were obtained using a citrate–phosphate buffer. After toxin incubation with sodium metabisulphite, the aliquots were extensively dialyzed against a 10 mM citrate–phosphate buffer (pH 4.5) and assayed for killer activity as previously described. The temperature and pH used for the assays at different ethanol, glucose and SO₂ were 20 °C and pH 4.5.

The stability of TdKT under oenological conditions was also examined by testing the residual activity after incubation (1:10 v/v) for 72 h at 20 °C in Sauvignon Blanc grape must (pH 3.7; initial sugar content, 14.6%; total SO₂, 150 ppm) and in Malbec red wine (pH 2.2; ethanol 12% v/v; total SO₂, 50 ppm). After toxin incubation, the aliquots were assayed for killer activity as previously described. All experiments were carried out in duplicate.

2.4.3. Identification of cell wall putative binding sites for the killer toxins

In order to determine the primary toxin binding sites in the yeast cell wall, WTM and MWM assays were performed, as mentioned above. Sensitive yeast *C. glabrata* NCYC 388 growing exponentially at 20 °C for 24 h (10⁹ cells/mL) was treated with the killer toxins in the absence or presence of the following polysaccharides: laminarin, pustulan, curdulan, mannan, chitin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and pullulan (Elicityl, Colles France). Polysaccharides (1 mg/μL) were added to the killer toxin extract (15 AU) and incubated for 4 h at 20 °C. The residual killer activities were tested against the sensitive strains by WTM and MWM.

2.4.4. Determination of chitinase and β-glucanase activities

Chitinase activity was assayed by a DNS method (Miller, 1959) using 1% colloidal chitin (w/v) as substrate. One unit of chitinase activity (UCh) was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of N-acetylglucosamine (GlcNAc) in the reaction mixture per hour. The standard curve was prepared using GlcNAc.

β-1,3-β-glucanase activity of the killer toxin was determined according to Wang et al. (2007) using 0.25% laminarin (w/v) as substrate. The

active against these undesired microorganisms seems interesting. Hence, the use of selected killer yeasts as a biocontrol method may be related to the improvement of the food industry by reducing the requirement for chemical preservatives (5, 9, 33). In previous studies carried out in our laboratory, the majority of yeasts isolated from spontaneously fermenting grape must have evidenced the killer character (18, 29, 30, 33). The high variability in the killer phenomenon detected within different producer species provides an exceptional source of antagonist yeasts to be used in biocontrol. In particular, killer yeasts belonging to *Metschnikowia pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomala* (ex *Pichia anomala*) and *Torulasporea delbrueckii* species have shown the broadest killer spectrum against wine spoilage yeasts (19, 33).

As a general rule, most studies on killer behaviour use the seeded-agar-plate technique based on the screening procedure described by Makower and Bevan (23) due to its simplicity and low cost (1, 2, 31, 41). In this traditional qualitative (QLM) experimental approach, yeasts to be tested for sensitivity are seeded as a lawn and the yeasts to be assayed for killer activity are streaked over the surface of the solidified YEPD-MB agar medium. Killer activity is then evidenced by the presence of a growth inhibition halo of the target yeast around the killer yeast streak.

Some slight modifications in the composition of the killer medium were reported, including the addition of glycerol or NaCl as well as variations in pH and temperature (7). However, these modifications were not adopted in general routine killer assays. The use of NaCl in the killer medium was particularly proposed for halotolerant yeasts isolated from olive brines, soy sauce, pickled radish, etc. (11, 16, 39).

The aim of the present work was to develop an alternative rapid and effective semiquantitative killer assay for biocontrol yeast selection. The effect of the addition of different NaCl concentrations as well as the use of serial dilutions of each killer yeast on the detection and comparison of different killer yeasts against spoilage yeasts was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Yeast isolates

Thirty six killer yeasts: 14 *M. pulcherrima*, 13 *W. anomala* and 9 *T. delbrueckii* isolates, from the North Patagonian Culture Collection (NPCC, Neuquén, Argentina) were used (Table 1). All killer yeasts used in this work were selected from screening surveys on yeasts isolated from wine related environments (19, 30, 33). In addition, we analyzed the killer activity of five reference strains including the type isolates of the three species previously mentioned (Table 1).

Three target strains were used: *Pichia guilliermondii* NPCC 1037 and *Pichia membranifaciens* NPCC 1108 (both species classified as potential wine spoilage yeasts) and *Candida glabrata* NCYC 388 (sensitive reference isolate).

Detection of killer activity

In both cases, the seeded-agar-plate technique was used. In this technique, each target yeast isolate is suspended in sterile water (10^6 cells/ml) and 1 ml of this suspension is seeded as a lawn onto 10 ml of molten YEPD-MB agar plates (g/l: yeast extract 1, malt extract 3, glucose 20, peptone 2, agar 20, methylene blue

Table 1. Autochthons and reference killer yeast strains.

Killer species and reference number ⁽¹⁾	Origin
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
NPCC 1001	Red grape surface
NPCC 1002	Red grape surface
NPCC 1003	Fermenting apple must
NPCC 1004	Fermenting Malbec must
NPCC 1005	Fermenting Malbec must
NPCC 1006	Fermenting Malbec must
NPCC 1007	Fermenting Malbec must
NPCC 1008	Fermenting Trousseau must
NPCC 1009	Fermenting Trousseau must
NPCC 1010	Fermenting Trousseau must
NPCC 1011	Fermenting Trousseau must
NPCC 1012	Fermenting Trousseau must
NPCC 1013	Fermenting Trousseau must
NPCC 1014	Fermenting Trousseau must
NRRL Y711	Grape surface
<i>Wickerhamomyces anomala</i>	
NPCC 1015	Wine vats surfaces
NPCC 1016	Wine vats surfaces
NPCC 1017	Wine vats surfaces
NPCC 1018	Wine vats surfaces
NPCC 1019	Wine vats surfaces
NPCC 1020	Wine vats surfaces
NPCC 1021	Wine vats surfaces
NPCC 1022	Fermenting Semillon must
NPCC 1023	Fermenting Malbec must
NPCC 1024	Fermenting Malbec must
NPCC 1025	Fermenting Malbec must
NPCC 1026	Fermenting Malbec must
NPCC 1027	Fermenting Malbec must
NCYC 434	Unknown (K5 type)
NCYC 435	Unknown (K8 type)
NRRL Y366	Fermenting must
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	
NPCC 1028	Red grape surface
NPCC 1029	Wine vats surfaces
NPCC 1030	Wine vats surfaces
NPCC 1031	Wine vats surfaces
NPCC 1032	Fermenting Merlot must
NPCC 1033	Fermenting Merlot must
NPCC 1034	Fermenting Merlot must
NPCC 1035	Fermenting Malbec must
NPCC 1036	Fermenting Malbec must
NRRL Y866	Unknown

0.003, buffered at pH 4.6 with 0.5 M phosphate-citrate). Different NaCl concentrations (0, 1 or 3% w/v) were added to the killer medium in order to evaluate its effect in the improvement of killer activity detection. Young cultures (48 h in YEPD agar at 26 °C) of both sensitive and killer yeasts were used for killer assays. All experiences were carried out in triplicate.

In QLM, the seeded plates were streaked with thick smears of killer cultures and incubated at 18 ± 2 °C for 48-72 h. The lawn target yeast isolate was designated as sensitive when a clear zone of growth inhibition was observed surrounding the killer cultures streaks (23).

In QTM, 48 h cultures of all isolates to be tested for killer activity were resuspended in sterile water (10^{10} cells/ml) and five serial decimal dilutions were carried out in sterile water. Five microliters of all six consecutive dilutions were spotted on seeded plates and incubated at 18 ± 2 °C for 48-72 h. The diameter of the inhibition halo around the spot was used as a measurement of the killer activity. Halo areas for each sensitive/killer isolates combination were measured on digitalized images (Nikon Image Software (NIS) ver. 3.00), as previously reported (3).

Killer yeasts were evaluated according to two different concepts: (i) effectiveness, defined as the percentage of isolates showing killer activity against a particular sensitive isolate over the total number of yeasts tested, and (ii) specific productivity, defined as a relationship between the production of toxins (size of the inhibition halo) and the number of killer cells assayed (alliquots of known concentration).

The evaluation of dose-response results (killer cell counts vs. inhibition halo in mm) was carried out by lineal regression (Sigma Plot 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

According to previous studies carried out in our laboratory, as well as in other laboratories worldwide, *M. pulcherrima*, *W. anomala* and *T. delbrueckii* killer yeasts species showed a significant inhibitory effect on the growth of different spoilage yeasts (6, 27, 32, 33).

In order to evaluate the effect of NaCl addition on killer behaviour, the three killer species previously described were evaluated against two wine spoilage yeast strains belonging to species *P. guilliermondii* (strain NPCC 1037) and *P. membranifaciens* (strain NPCC 1108) as well as

against the sensitive reference strain *Candida glabrata* NCYC 388. The results using the QLM evidence an increase in halo size in the presence of 1 and 3% (w/v) NaCl with regard to the control (Table 2). Moreover, in some cases killer activity was evidenced only when NaCl was added to the medium (Table 2) (e.g. killer activity of *M. pulcherrima* against *C. glabrata*), indicating that the addition of a NaCl percentage to the killer medium can be an interesting factor to be taken into account for killer yeast screening.

Qualitative methodological procedure (QLM) offers some economy of labor when a large number of yeasts are handled. However, it has been wrongly utilized in many studies for the definition of weak or strong phenotypes according to the extent of the halo produced by the streak (14, 26, 40, 42). We consider that this is an incorrect extrapolation of the methodology for the evident variation in the quantity of cells in the killer yeast streak. Based on this issue, we propose a new semiquantitative method (QTM) to evaluate killer activity which may provide a new and improved tool for selection of yeast isolates to be used as potential biocontrol agents. Killer yeasts in known concentrations were assayed using aliquots of six serial decimal dilutions from 10^{10} to 10^6 cells/ml on YEPD-MB agar plates containing the same sensitive isolates and the same NaCl concentrations previously used in the QLM (Table 3). As a general rule, a gradual increase of the growth inhibition halo was observed proportionally with the increasing amount of killer cells (Table 3 and Figure 1). Again, the addition of NaCl allowed a clearer visualization of the halos; however a delay in the growth of target yeasts in the medium supplemented with 3% NaCl was also exhibited. As shown in Table 3, the highest correlation values between dose (killer cell counts) and response (inhibition halos in mm) were obtained with the addition of 1% NaCl. According to these results, the optimum amount of 1% (w/v) of NaCl was selected to be

Table 2. Killer activity (mm) at different NaCl concentrations of *M. pulcherrima*, *W. anomala* and *T. delbrueckii* type strains against target strains by QLM.

Target species	NaCl % (wt/v)	Killer species		
		<i>M. pulcherrima</i> NRRL Y711	<i>W. anomala</i> NRRL Y366	<i>T. delbrueckii</i> NRRL Y866
<i>P. guilliermondii</i> NPCC 1037	0	-	2.3 ± 0.4	2.1 ± 0.5
	1	-	3.8 ± 0.2	4.3 ± 0.3
	3	-	3.9 ± 1.1	2.5 ± 0.8
<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1108	0	-	-	-
	1	-	-	-
	3	-	-	-
<i>C. glabrata</i> NCYC 388	0	-	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.5
	1	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.5	2.8 ± 0.2
	3	-	4.2 ± 1.5	3.5 ± 0.9

Pichia anomala DBVPG 3003 Secretes a Ubiquitin-Like Protein That Has Antimicrobial Activity^V

Jessica De Ingeniis,^{1,2} Nadia Raffaelli,¹ Maurizio Ciani,² and Ilaria Mannazzu^{2,3*}

Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Via Ranieri, 60131 Ancona, Italy¹;
Dipartimento SAIFET sez di Microbiologia Alimentare, Industriale e Ambientale, Università Politecnica delle Marche,
Via Breccia Bianche, 60131 Ancona, Italy²; and *Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e*
Biotecnologie Agroalimentari, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italy³

Received 8 August 2008/Accepted 16 December 2008

The yeast strain *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a killer toxin (Pikt) that has antifungal activity against *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts. Pikt interacts with β -1,6-glucan, consistent with binding to the cell wall of sensitive targets. In contrast to that of toxin K1, secreted by *Saccharomyces cerevisiae*, Pikt killer activity is not mediated by an increase in membrane permeability. Purification of the toxin yielded a homogeneous protein of about 8 kDa, which showed a marked similarity to ubiquitin in terms of molecular mass and N-terminal sequences. Pikt is also specifically recognized by anti-bovine ubiquitin antibodies and, similar to ubiquitin-like peptides, is not absorbed by DEAE-cellulose. However, Pikt differs from ubiquitin in its sensitivity to proteolytic enzymes. Therefore, Pikt appears to be a novel ubiquitin-like peptide that has killer activity.

After its initial discovery in *Saccharomyces cerevisiae* (2), the killer phenotype has been found in yeasts belonging to the genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Williopsis*, and *Zygosaccharomyces* (9, 16, 19, 25, 28, 53, 56). The distribution of this character among natural yeast isolates and in laboratory strains is accompanied by killer toxins with large biodiversity, in terms of their biochemical characteristics, genetic determinants, and spectra of action (25). In spite of this diversity, all known killer toxins are proteins (1, 31) or glycoproteins (5, 11, 28, 43, 54) that kill sensitive cells via a two-step mode of action. During the first step, the killer toxin binds a receptor site on the cell wall of its sensitive target. In the second step, which has been far less characterized, the killer toxin is assumed to interact with receptors on the cell membrane and to kill the sensitive cells via different mechanisms. These include cell membrane permeabilization, cell cycle perturbation, inhibition of DNA synthesis, and inhibition of β -1,3-glucan synthetase activity (7, 14, 15, 41, 49, 53).

As the spectrum of action of some toxins has extended to microbial pathogens of clinical interest, killer toxins and/or killer toxin-like antibodies and mimotopes are of great relevance to medicine (8, 25). Other toxins that exert a killing action on spoilage yeasts have interesting applications in the fermentative (46) and food and feed industries (10, 11, 12, 23, 32, 44), where they can be used as “natural” food antimicrobials.

In a previous study, we showed that *Pichia anomala* DBVPG 3003 produces a killer toxin (known as Pikt) that is active against *Dekkera/Brettanomyces* sp. yeasts (12). These yeasts can

develop in white and red wines, resulting in unpleasant odors and tastes (18). Thus, they represent a major problem in the wine industry. Pikt is stable at acidic pH and in a range of temperatures between 20°C and 40°C (12), as are other toxins produced by different strains of *P. anomala* (25, 26, 37). Moreover, Pikt maintains its killing activity for at least 10 days in wine. Thus, it shows potential applications as a natural antimicrobial in the wine industry (12).

The present study investigates the mode of action of Pikt and the biochemical properties of the purified protein.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, media, and growth conditions. The yeast strains used in this study are listed in Table 1. The media were YEPD (1% yeast extract, 2% glucose, 2% peptone, and 1.8% agar when required) for medium-term storage at 4°C, YEPD_{pH 4.4} (YEPD with 100 mM citrate-phosphate buffer, pH 4.4, for Pikt production), YEPD_{pH 4.5} (YEPD with 100 mM citrate-phosphate buffer, pH 4.5, for K1 production), YEPD_{pH 6} (YEPD with 50 mM Na-phosphate buffer, pH 6, for the production of the *K. lactis* killer toxin), GYNB_{pH 4.4} (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base, with 100 mM citrate-phosphate buffer, pH 4.4, for Pikt purification), and malt agar (Difco, Voigt Global Distribution Inc., Lawrence, KS) buffered as indicated above for the well test assay. *P. anomala* DBVPG 3003 and *S. cerevisiae* DBVPG 6497 were grown at 20°C with shaking (150 rpm). *Kluyveromyces fragilis* DBVPG 6727 was grown at 25°C with shaking (200 rpm).

Killing assays. Well test assays were carried out as described by Woods and Bevan (52). Briefly, 70 μ l of toxin samples was filter sterilized through 0.45- μ m-pore-size membrane filters (Millipore Corp., Bedford, MA) and then loaded into wells (7-mm diameter) cut in malt-agar plates that had previously been seeded with 10^5 cells ml⁻¹ of a strain sensitive to the toxin. The killing activity was evaluated as the diameter of the zone of inhibition around the wells after incubation for 72 h at 20°C and was defined as the mean zone of inhibition of replicate wells. The linear relationship observed between the logarithm of killer toxin concentration and the diameter of the inhibition halo from the well test was used to define Pikt activity in arbitrary units (AU). One AU was defined as the amount of toxin contained in 70 μ l that generated an inhibition halo of 8 mm. One AU corresponds to about 10 ng of killer protein.

Toxin production. The killer toxins were produced in 1.0 liter of YEPD buffered as required. After 48 h of growth, the culture broths were centrifuged (5,000 \times g for 10 min at 4°C), and the supernatants were microfiltered through 0.45- μ m membranes (Millipore Corp., Bedford, MA) and concentrated 100-fold by ultrafiltration (stirred ultrafiltration cells; Millipore Corp., Bedford, MA)

* Corresponding author. Mailing address: Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italy. Phone: 39-079-229314. Fax: 39-079-229370. E-mail: i.mannazzu@uniss.it.

^V Published ahead of print on 29 December 2008.

Change pathway type

Option

Scale: 100%

Search

ID search

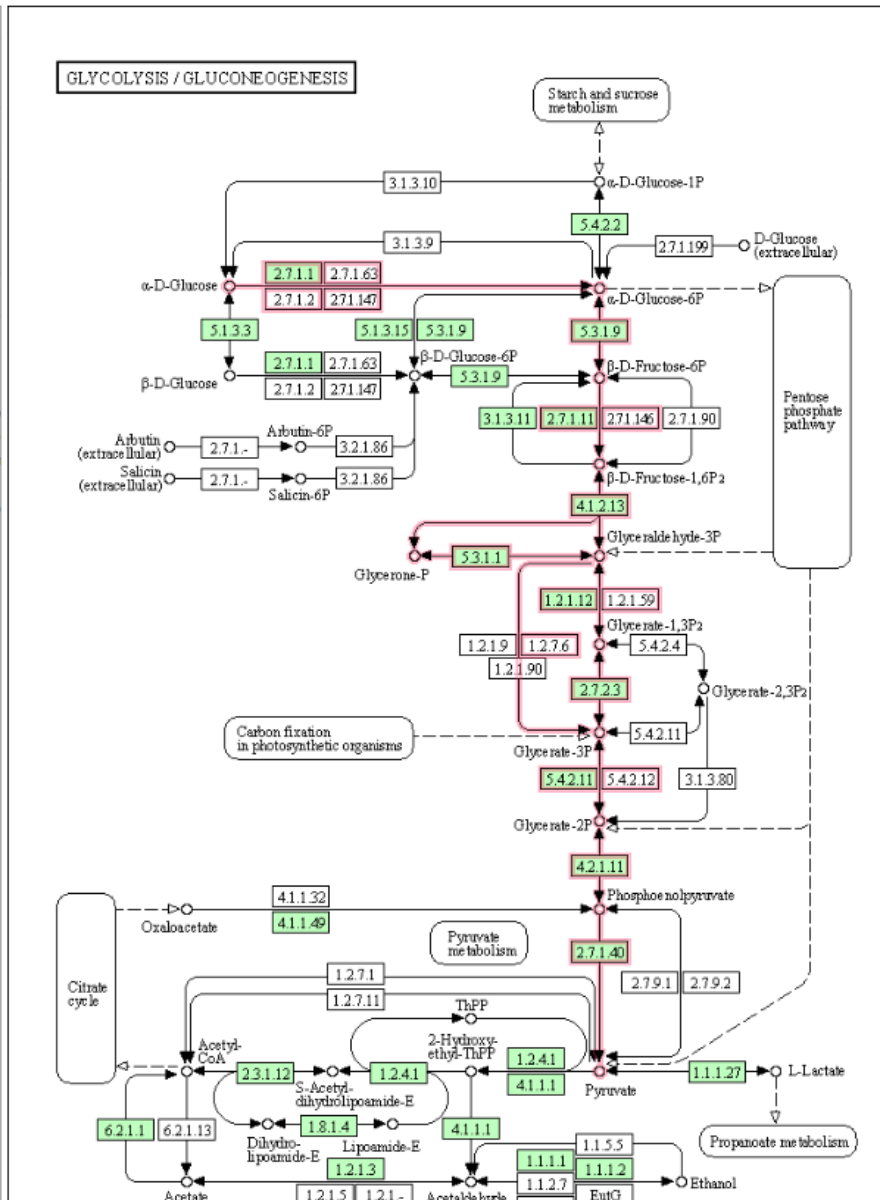
Color

Module

Complete only

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
 - Central carbohydrate metab
 - M00001 Glycolysis (Emb
 - M00002 Glycolysis, core n
 - M00003 Gluconeogenesis
 - M00307 Pyruvate oxidatio



KEGG Citrate cycle (TCA cycle) - *Torulaspora delbrueckii*

[Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Show description | Download | Help]

Change pathway type

Option

Scale: 100%

Search

ID search

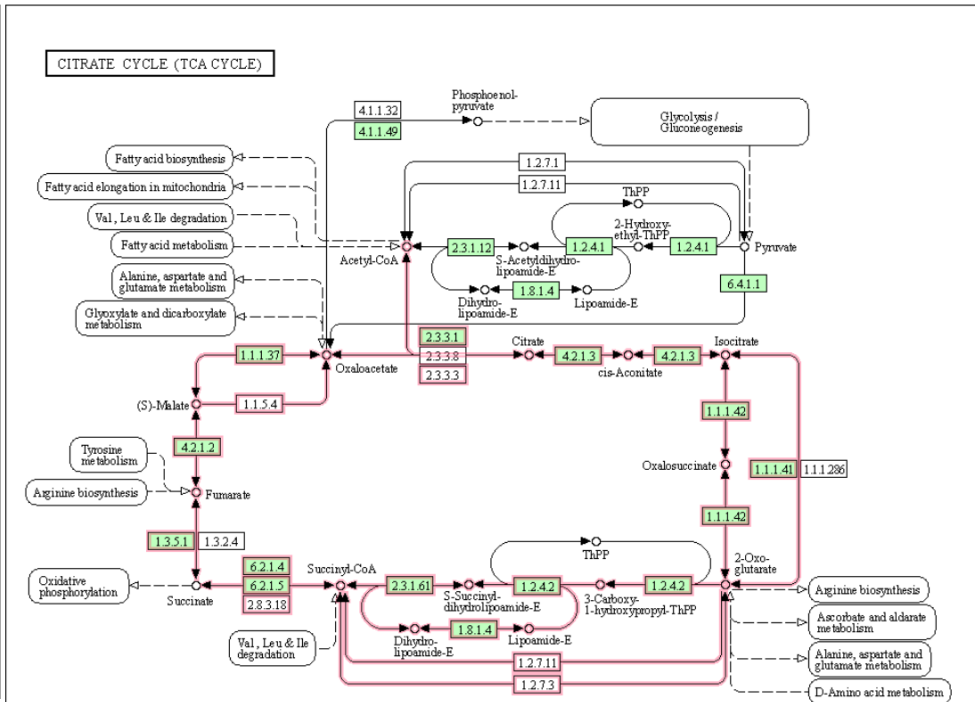
Color

Module

Complete only

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metab
- M00003 Gluconeogenesis
- M00307 Pyruvate oxidatio
- M00009 Citrate cycle (TC4)
- M00010 Citrate cycle, first
- M00011 Citrate cycle, sec



KEGG Pentose phosphate pathway - *Torulaspora delbrueckii*

[Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Show description | Download | Help]

Change pathway type

Option

Scale: 100%

Search

ID search

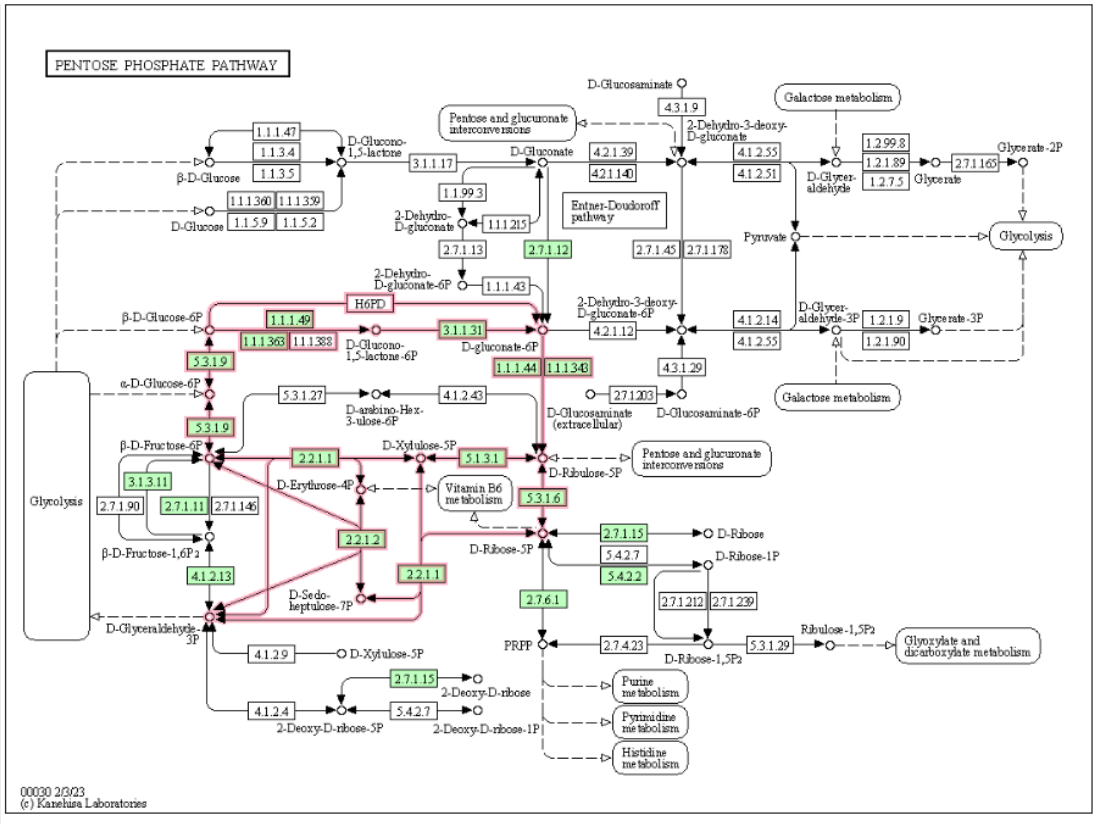
Color

Module

Complete only

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metabolism
- M00004 Pentose phosphate pa
- M00006 Pentose phosphate pa
- M00007 Pentose phosphate pa
- M00005 PRPP biosynthesis



САНИМАКС

Викопіювання Державного реєстру дезінфекційних засобів - 2019 рік

№	Назва засобу, вміст діючих речовин	Назва заявника продукції, країна, місце знаходження	Назва виробника продукції, країна, місцезнаходження	Об'єкти застосування	Номер свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу і дата видачі *	Термін дії до	Установа, заклад державної санітарно-епідеміологічної служби (експертна комісія), яка видала висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи
56	Засіб дезінфекційний "Санімакс" (діючі речовини, мас. %: комплекс четвертинних амонієвих сполук - 50,0 (октилдидиметиламоній хлорид - 15,0; алкілдиметилбензиламоній хлорид - 20,0; дидецилдиметиламоній хлорид - 7,5; діоктилдиметиламоній хлорид - 7,5)	ТОВ "Інтердес", Україна, 01011, м. Київ, Печерський узвіз 15.	ТОВ "Інтердес", Україна, 01011, м. Київ, Печерський узвіз 15.	Заклади охорони здоров'я, учбово-виховні, комунально-побутові, підприємства харчопереробної, фармацевтичної, парфумерно-косметичної, промисловості; заклади ресторанного господарства і торгівлі; житлові, громадські, культурно-освітні, видовищні, спортивно-оздоровчі споруди, всі види транспорту, побут тощо.	01.02.2019	01.02.2024	ДУ "Інститут медицини праці НАМН України" висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 602-123-20-5/2314 від 10.02.2017

* Примітка: Графа 6 "Номер свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу і дата видачі" мається на увазі дата внесення дезінфекційного засобу в реєстр.

Об'єкт дезінфекції	Концентрація робочого розчину, % (за препаратом)	Час експозиції, хв									Спосіб знезараження
		Кишкові і крапельні інфекції бактеріальної етіології (окрім туберкульозу)	Mycobacterium B5	Mycobacterium terrae	Респіраторні інфекції вірусної етіології (в т.ч. герпес, грип, парагрип, SARS тощо)	Парентеральні інфекції вірусної етіології (в т.ч. гепатити В, С, СНІД**)	Поліовірусна інфекція, гепатит А	Кандидози	Дерматомікози		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Поверхні приміщень (підлога, стіни, двері, поручні тощо), тверді меблі, транспортні засоби тощо	0,04	60	-	-	-	-	-	60	-	Протирання або зрошення	
	0,075	30	-	-	-	-	-	30	-		
	0,09	-	-	-	10	-	-	-	-		
	0,1	10	-	-	-	-	-	10	60		
	0,15	-	-	-	-	-	-	-	30		
	0,17	-	-	-	-	-	10	-	-		
	0,2	-	-	-	-	-	-	30	-		
	0,25	-	60	-	-	-	-	-	-		
Медичне обладнання, апарати, прилади, (в т.ч. кувети, апарати ШВЛ і УЗД тощо), холодильне обладнання, візки для транспортування білизни і медичних відходів	0,04	60	-	-	-	-	-	60	-	Протирання або зрошення	
	0,075	30	-	-	-	-	-	30	-		
	0,09	-	-	-	10	-	-	-	-		
	0,1	10	-	-	-	-	-	10	60		
	0,15	-	-	-	-	-	-	-	30		
	0,17	-	-	-	-	-	10	-	-		
	0,2	-	-	-	-	-	-	30	-		
	0,25	-	60	-	-	-	-	-	30		
2,0	-	-	60	-	-	-	-	-			

ДЕЗЕКОН

Викопіювання з Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 рік

№	Назва засобу, вміст діючих речовин	Назва заявника продукції, країна, місцезнаходження	Назва виробника продукції, країна, місцезнаходження	Об'єкти застосування	Номер свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу і дата видачі *	Термін дії до	Установа, заклад державної санітарно-епідеміологічної служби (експертна комісія), яка видала висновок державної
235	засіб дезінфекційний «Дезекон» (діючі речовини: комплекс четвертинних амонієвих сполук не менше 5,5%, в т.ч. алкілдиметилбензиламоній хлорид - 2,2%; октилдидиметиламоній хлорид - 1,65%; дидидиметиламоній хлорид - 0,825%; діоктилдидиметиламоній хлорид - 0,825%)	ТОВ «Український науково-виробничий центр проблем дезінфекції». Україна, 04107, м. Київ, вул. Нагірна, 6/31, літ. А, тел./факс: (044) 461-93-73, код за ЄДРПОУ 25636704	ТОВ «Український науково-виробничий центр проблем дезінфекції». Україна, 04107, м. Київ, вул. Нагірна, 6/31, літ. А, тел./факс: (044) 461-93-73, код за ЄДРПОУ 25636704	заклади і установи охорони здоров'я, дитячі дошкільні, учбово-виховні і освітні, комунально-побутові, спортивно-оздоровчі, ресторанного господарства і торгівлі, промислові підприємства, у т.ч. харчопереробної, фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної промисловості; транспорт (в т.ч. пасажирський залізничний, автомобільний метрополітен, авіаційний, для перевезення харчових продуктів тощо), житлові і громадсько-адміністративні будівлі тощо; у побутових умовах. Оптова і роздрібна торгівля.	17.04.2020	17.04.2025	Державна установа "Інститут медицини праці ім. Ю.І.Кундієва НАМН України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/26638 від 03.12.2019 р.

* Примітка: Графа 6 "Номер свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу і дата видачі" мається на увазі дата внесення дезінфекційного засобу в реєстр.

Об'єкт дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Час експозиції, хв							Спосіб знезараження
		Кишкові і крапельні інфекції бактеріальної етіології (окрім туберкульозу)	Mycobacterium B5	Mycobacterium terrae	Респіраторні інфекції вірусної етіології (в т.ч. герпес, грип, паратрип, SARS тощо)	Парентеральні інфекції вірусної етіології (в т.ч. гепатити В, С, СНІД**)	Кандидози	Дерматомікози	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Поверхні в приміщеннях (підлога, стіни, двері, поручні тощо), тверді меблі, транспортні засоби тощо	0,4	30*	-	-	-	-	-	-	Протирання або зрошення
	0,8	30	-	-	-	-	-	-	
	1,0	-	-	-	10	30	30	60	
	1,5	10	90	-	-	10	10	30	
	17,0	-	-	60	-	-	-	-	
Медичне обладнання, апарати, прилади, (в т.ч. кувези, апарати ШВЛ і УЗД тощо), холодильне обладнання, візки для транспортування білизни і медичних відходів	0,4	30*	-	-	-	-	-	-	Протирання або зрошення
	0,8	30	-	-	-	-	-	-	
	1,0	-	-	-	10	30	30	60	
	1,5	10	90	-	-	10	10	30	
	17,0	-	-	60	-	-	-	-	

МАКСИСАН-

Викопіювання з Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 рік

№	Назва засобу, вміст діючих речовин	Назва заявника продукції, країна, місцезнаходження	Назва виробника продукції, країна, місцезнаходження	Об'єкти застосування	Номер свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу і дата видачі *	Термін дії до	Установа, заклад державної санітарно-епідеміологічної служби (експертна комісія), яка видала висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 602-123-20-5/3349 від 19.02.2019 р.
234	Засіб дезінфекційний «Максисан» (діючі речовини: комплекс четвертинних амонієвих сполук не менше 50,0% (в т.ч. алкїлдиметилбензиламоній хлорид - 20,0%; октилдецилдиметиламоній хлорид - 15,0%; додецилдиметиламоній хлорид - 7,5%; діоктилдиметиламоній хлорид - 7,5%)	ТОВ «Український науково-виробничий центр проблем дезінфекції». Україна, 04107, м. Київ, вул. Нагірна, 6/31, літ. А, тел./факс: (044) 461-93-73, код ЄДРПОУ 25636704.	ТОВ «Український науково-виробничий центр проблем дезінфекції». Україна, 04107, м. Київ, вул. Нагірна, 6/31, літ. А, тел./факс: (044) 461-93-73, код ЄДРПОУ 25636704.	заклади і установи охорони здоров'я, дитячі дошкільні, учбово-виховні і освітні, комунально-побутові, спортивно-оздоровчі, ресторанного господарства і торгівлі, промислові підприємства, у т.ч. харчопереробної, фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної промисловості; транспорт (в т.ч. пасажирський залізничний, автомобільний метрополітен, авіаційний, для перевезення харчових продуктів тощо), житлові і громадсько-адміністративні будівлі тощо; у побутових умовах. Оптова і роздрібна торгівля.	17.04.2020	17.04.2025	Державна установа "Інститут медицини праці ім. Ю.І.Кундієва НАМН України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 602-123-20-5/3349 від 19.02.2019 р.

* Примітка: Графа 6 "Номер свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу і дата видачі" мається на увазі дата внесення дезінфекційного засобу в реєстр.

Таблиця 3. Режими дезінфекції розчинами засобу «Максисан» при різних інфекціях

Об'єкт дезінфекції	Концентрація робочого розчину, % (за препаратом)	Час експозиції, хв								Спосіб знезараження
		Кишкові і крапельні інфекції бактеріальної етіології (окрім туберкульозу)	Mycobacterium B5	Mycobacterium terrae	Респіраторні інфекції вірусної етіології (в т.ч. герпес, грип, парагрип, SARS тощо)	Парентеральні інфекції вірусної етіології (в т.ч. гепатити В, С, СНІД**)	Поліовірусна інфекція, гепатит А	Кандидози	Дерматомікози	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Поверхні приміщень (підлога, стіни, двері, поручні тощо), тверді меблі, транспортні засоби тощо	0,04	60	-	-	-	-	-	60	-	Протирання або зрошення
	0,075	30	-	-	-	-	-	30	-	
	0,09	-	-	-	10	-	-	-	-	
	0,1	10	-	-	-	-	-	10	60	
	0,15	-	-	-	-	-	-	-	30	
	0,17	-	-	-	-	10	-	-	-	
	0,2	-	-	-	-	-	30	-	-	
	0,25	-	60	-	-	-	-	-	-	
Медичне обладнання, апарати, прилади, (в т.ч. апарати ШВЛ і УЗД тощо), холодильне обладнання, візки для транспортування білизни і медичних відходів	0,04	60	-	-	-	-	-	60	-	Протирання або зрошення
	0,075	30	-	-	-	-	-	30	-	
	0,09	-	-	-	10	-	-	-	-	
	0,1	10	-	-	-	-	-	10	60	
	0,15	-	-	-	-	-	-	-	30	
	0,17	-	-	-	-	10	-	-	-	
	0,2	-	-	-	-	-	30	-	-	
	0,25	-	60	-	-	-	-	-	30	
2,0	-	-	60	-	-	-	-	-		

САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ-САНАЦІЯ

Застосування засобу САНПРОФ-Універсал-Санація

Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,1% до 10,0% (за препаратом), що залежить від виду забруднення, об'єкту і мети обробки.

Способи обробки: протирання, миття в розчині, заповнення, замочування, занурення.

Медицина, заклади соціального захисту

- ✓ миття будь-яких вологостійких поверхонь в лікувальних, діагностичних приміщеннях і палатах, приміщеннях загального користування: підлога, стіни, підвіконня, двері, радіатори, меблі, поруччя тощо;
- ✓ миття медичних виробів, забруднених біологічними рідинами перед дезінфекцією та ПСО, предметів догляду за хворими, столового і лабораторного посуду, санітарно-технічного устаткування;
- ✓ миття, видалення органічних матеріалів з виробів перед дезінфекцією напівкритичних медичних виробів та дезінфекцією і стерилізацією критичних медичних виробів;
- ✓ ПСО медичних виробів і інструментів закладів «індустрії краси» перед стерилізацією;
- ✓ поточні і генеральні прибирання в ЗОЗ, закладах соціального захисту, місцях постійного або тимчасового проживання та ін.