

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 ____ 2023 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«__» ____ червня ____ 2023 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 поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності конкурентних бактерій *Bacillus subtilis* БТ-2»

Виконала: здобувачка IV курсу, групи 2

Благодир Дар'я Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник

Пирог Тетяна Павлівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Валентина ЖДАНЮК

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
“ 01 ” березня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БЛАГОДИР Дар'ї Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності конкурентних бактерій *Bacillus subtilis* БТ-2»,
керівник роботи ПИРОГ Тетяна Павлівна, д.б.н., проф.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року №193-кx

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241;
цільовий продукт: поверхнево-активні речовини (ПАР); біологічний індуктор:
Bacillus subtilis БТ-2; геометричний об'єм ферментера: 0,5 м³; коефіцієнт заповнення:
0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1.
Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.
РОЗДІЛ 4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт. РОЗДІЛ 5.
Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ 6.
Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль
виробництва. РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації
виробництва. РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу ПАР – 4 аркуші формату А1. Апаратурна схема
виробництва ПАР – 1 аркуш формату А1. Схема біотрансформації ростового
субстрату у кінцевий продукт – 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>04.03.23-11.03.23</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>11.03.23-18.03.23</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>18.03.23-02.04.23</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>02.04.23-15.04.23</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>15.04.23-02.05.23</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>02.05.23-10.05.23</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>10.05.23-17.05.23</i>	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>17.05.23-31.05.23</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>17.05.23-31.05.23</i>	

Здобувач

(підпис)

Дар'я БЛАГОДИР

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Тетяна ПИРОГ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота спрямована на розроблення технологічної та апаратурної схем біосинтезу комплексу поверхнево-активних речовин (ПАР) із використанням біологічного агента *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, який синтезує ПАР у концентрації 3,6 г/л за наявності у середовищі культивування продуцента у якості біологічного індуктора суспензії інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ-2 з метою підвищення антимікробної активності ПАР при умові росту на відходах виробництва біодизелю. Мікробні ПАР пропонується використовувати як домішки до мийно-дезінфікуючих засобів для поточного прибирання приміщень – дезінфекції поверхонь (підлоги та стін (кахель)) у інфекційних лікарнях, а саме Львівській обласній клінічній інфекційній лікарні. Відповідно до даних про загальну площу приміщень даної лікарні, яка становить близько 31 тис. м², розрахована потужність виробництва сухих ПАР складає 12,5 кг/рік (4 516,4 л культуральної рідини).

Технологічна схема біосинтезу комплексу ПАР включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища, приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів, приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу) та технологічний процес (три стадії вирощування інокуляту та біосинтез у ферментері об'ємом 0,5 м³ із коефіцієнтом заповнення – 0,6).

Крім того, технологічна схема передбачає приготування біологічного індуктора – суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2, яка включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища, приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів, приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу, приготування і стерилізація запасного розчину глюкози) та технологічний процес (дві стадії вирощування інокуляту та його інактивація).

Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методики контролю концентрації, а саме: біомаси, цільового продукту (ПАР), амонійного азоту, гліцерину, глюкози.

Дипломний проєкт викладений на 151 сторінці, містить 30 таблиць, 11 рисунків, складається із вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (106

найменувань), 30 додатків, технологічної (формат А1, 4 аркуші), апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем та схеми біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт (формат А3, 1 аркуш).

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Bacillus subtilis* БТ-2, інфекційні лікарні, мийно-дезінфікуючі засоби, виробничий біосинтез, відходи виробництва біодизелю.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB B-7241.....	11
1.1. Хімічний склад.....	11
1.2. Біологічні властивості.....	11
1.2.1. Антимікробні властивості.....	11
1.2.2. Антиадгезивні властивості.....	14
1.2.3 Руйнування біоплівки.....	15
1.3. Біоремедіація нафтових та комплексних із важкими металами нафтових забруднень за дії ПАР <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241.....	16
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	18
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	18
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.....	25
2.3. Морфолого-культуральні ознаки <i>A. calcoaceticus</i>	27
2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>A. calcoaceticus</i>	30
2.5. Таксономічний статус біологічного агента <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241.....	30
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ.....	31
3.1. Потреби населення України у поверхнево-активних речовинах для застосування у медицині.....	31
3.2. Розрахунок потужності виробництва поверхнево-активних речовин для миття підлоги та стін (кахлю) у інфекційних лікарнях.....	32
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу ПАР <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241.....	36
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ПАР <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241.....	37
3.5. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2.....	38

РОЗДІЛ 4. БІОТРАНСФОРМАЦІЯ РОСТОВОГО СУБСТРАТУ У ЦІЛЬОВИЙ ПРОДУКТ.....	41
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у продуцента ПАР.....	41
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	42
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	44
5.1. Вибір умов і способу культивування <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 – продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР).....	44
5.2. Вибір умов і способу культивування <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 – біологічного індуктора.....	45
5.3. Вибір типу ферментера для культивування <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 – продуцента ПАР.....	45
5.4. Вибір типу ферментера для культивування <i>B. subtilis</i> БТ-2 – біологічного індуктора.....	47
5.5. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	47
5.6. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва поверхнево-активних речовин.....	50
5.7. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва поверхнево-активних речовин	58
5.8. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 – продуцента ПАР.....	63
5.8.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 у колбах на качалці.....	66
5.8.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 у посівному апараті об’ємом 5 л...67	
5.8.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 у посівному апараті об’ємом 50 л.68	
5.8.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 у ферментері об’ємом 0,5 м ³	70

5.9. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2.....	72
5.9.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту <i>B. subtilis</i> БТ-2 у колбах на качалці.....	75
5.9.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту <i>B. subtilis</i> БТ-2 у посівному апараті об'ємом 10 л.....	76
5.10. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.....	78
5.10.1. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для підготовки поживних середовищ продуцента ПАР <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 та біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2.....	78
5.10.2. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для культивування продуцента ПАР <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 та біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2..	80
5.10.3. Обґрунтування вибору піногасників при культивуванні продуцента ПАР <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 та біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2.....	81
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	83
6.1. Специфікація обладнання.....	83
6.2. Обґрунтування продуктивності обраних фільтрів для підготовки аераційного повітря.....	87
6.3. Обґрунтування продуктивності обраних лічильників, вагового дозатору та насосів.....	90
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	93
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	110
8.1. Мікробіологічний контроль.....	110
8.1.1. Мікробіологічний контроль <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241.....	111
8.1.2. Мікробіологічний контроль біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2...	111
8.2. Визначення концентрації біомаси бактерій.....	112
8.3. Визначення концентрації цільового продукту – ПАР.....	113
8.4. Визначення концентрації джерела Карбону (гліцерин) у середовищі культивування <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241.....	114

8.5. Визначення концентрації джерела Карбону (глюкоза) у середовищі культивування біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2.....	114
8.6. Визначення концентрації джерела Нітрогену ((NH ₂) ₂ CO) у середовищі.....	114
8.7. Карта постадійного контролю.....	115
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА.....	129
9.1. Характеристика та розрахунок об'ємів рідких відходів виробництва ПАР.....	129
9.1.1. Утилізація рідких відходів виробництва ПАР.....	131
9.2. Характеристика та розрахунок газоповітряних відходів виробництва ПАР.....	132
9.2.1. Утилізація газоповітряних відходів виробництва ПАР.....	133
9.3. Характеристика та утилізація твердих відходів виробництва ПАР.....	134
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЄКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА.....	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	141
ДОДАТКИ.....	152

ВСТУП

Останніми роками можна спостерігати стабільно зростаючий попит на мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), які синтезуються широким спектром мікроорганізмів, завдяки їх багатofункціональним властивостям: екологічна чистота відповідно з можливістю легкого та швидкого біорозкладання, повна нетоксичність, хороші фізико-хімічні та біологічні властивості, використання мікроорганізмами дешевої сировини для їх синтезу, стабільні властивості щодо різних фізичних та хімічних факторів тощо [1, 2]. Враховуючи перераховані відмінні властивості мікробних ПАР, це дозволяє використовувати їх як альтернативу синтетичним у широкому спектрі біотехнологічних застосувань, включаючи нафтову та харчову промисловість, сільське господарство, миючі засоби, косметичну, шкіряну, текстильну, паперову та фармацевтичну промисловість, природоохоронні технології, медицину [1].

Використання цих речовин є потенційним вирішенням проблеми біоремедіації забруднюючих речовин, тим самим підвищуючи біодоступність, розчинність і подальшу біодеградацію гідрофобних органічних сполук, при цьому усуваючи потребу на додаткові процеси та зменшуючи експлуатаційні витрати [3]. У якості прикладу таких дій можна відмітити роль мікробних ПАР у відновленні нафтових залишків зі сховищ, біоремедіації забрудненого ґрунту та води, очищення нафтових розливів [1]. Розливи нафтових резервуарів у кількох частинах світу пошкодили мільйони квадратних кілометрів екологічно охоронюваних територій, проте застосування мікроорганізмів, які використовують сполуки нафтового походження, не завжди можуть повністю їх розкласти, а синтетичні ПАР часто утворюють вторинні забруднювачі, що вимагає пошуку їх природних замінників та використання в екологічно чистий спосіб – мікробних поверхнево-активних речовин [4].

Разом із цим передусє і вирішення такої задачі, як дорого вартісні

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП				Літ.	Арк.	Акрушів	
Розробив	Благодир Д. О.											
Консульт.											8	3
Керівник	Пирог Т. П.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Зав. каф.	Стабніков В. П.											

субстрати, що застосовують для синтезу ПАР, які можуть бути замінені на дешевші, а саме забруднюючі сполуки, до того ж для їх використання не потрібно попередніх етапів очистки. Відбувається так звана біоконверсія відходів у поверхнево-активні речовини, що є надзвичайно економічно вигідним, тим самим розв'язуючи дві проблеми одночасно [5].

Якщо говорити про біологічні властивості ПАР, які включають антимікробні та антиадгезивні властивості, у тому числі й руйнування біоплівки, то вони привертають неабияку увагу науковців, адже відіграють важливу роль у різних індустріальних галузях. Використання ПАР як антимікробних агентів замість антибіотиків, до яких мікроорганізми швидко набувають резистентності, характеризується великою перспективою та обумовлюють **актуальність** рішення проблеми колонізації мікроорганізмами технологічного обладнання та матеріалів (імплантатів, катетерів) у медичній сфері. Крім того, деякі мікробні ПАР були виділені як потенційні протипухлинні агенти, які беруть участь у кількох етапах внутрішньоклітинного молекулярного розпізнавання, що включає трансдукцію сигналу, диференціювання клітин та клітинну імунну відповідь [1, 6].

Виробництво мікробних поверхнево-активних речовин залежить від правильного вибору мікробних штамів, типу субстрату та технології біосинтезу. Продуцентами мікробних ПАР можуть бути бактерії: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *A. calcoaceticus* P1-1A, *Bacillus subtilis* #309, *B. subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* WAE, *P. aeruginosa* JBK1 [7-12]. *A. calcoaceticus* IMB B-7241 має суттєву перевагу над іншими, оскільки синтезує комплекс ПАР (3,6 г/л) із високою антимікробною активністю, використовуючи як субстрат відходи виробництва біодизелю, зберігання яких є потенційною екологічною проблемою через підвищену лужність, вміст залишків токсичного метанолу, високої концентрацій солей і вільних жирних кислот [13]. Підвищення антимікробної дії характеризується внесенням у середовище культивування біологічного індуктора – суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2.

Таке поняття як «co-cultivation» зацікавило чимало дослідників, зважаючи на багаточисельні наукові статті на дану тему. Причинами вибуху такого інтересу

визначають антибіотикорезистентність через надмірне та необґрунтоване їх використання; підвищення антимікробної активності та/або синтезу цільового продукту, а також, можливе утворення нових метаболітів, нехарактерних для монокультури-продуцента у результаті спільного культивування продуцентів антимікробних сполук із конкурентними мікроорганізмами [7].

Мета кваліфікаційної роботи – проєктування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) поверхнево-активних речовин штамом *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності у середовищі культивування продуцента конкурентних бактерій *B. subtilis* БТ-2.

Новизною даної роботи є використання бактеріального штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у якості біологічного агента у поєднанні із суспензією інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 як біологічного індуктора для отримання комплексу поверхнево-активних речовин із високою антимікробною активністю під час росту на середовищі, компонентом якого є відходи виробництва біодизелю.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241

1.1. Хімічний склад

Поверхнево-активні речовини (ПАР), синтезовані нафтоокислюючими бактеріями *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на етанолі, за своєю хімічною природою – це комплекс нейтральних (C_{13} – C_{18} -*n*-алканолі, C_{11} – C_{22} -*n*-алканові та міколові кислоти), гліко- (трегалозомоно- і диміколати; трегалозомоно- і діацелати) та аміноліпідів. Згідно із літературними даними, аміноліпіді є ефективнішими антимікробними агентами, ніж гліколіпіді, а нейтральні ліпіді характеризуються дуже низькою антимікробною активністю, тому збільшення частки аміноліпідів може супроводжуватися посиленням антимікробної активності ПАР. Унікальною властивістю штаму IMB B-7241 є синтез, не притаманний для них, трегалозоміколатів, які зазвичай асоційовані з клітинною поверхнею і синтезуються за умов росту продуцентів на вуглеводневих субстратах, при цьому підвищуючи їх доступність для клітин [14, 15].

1.2. Біологічні властивості

ПАР, отримані *A. calcoaceticus* IMB B-7241, володіють різноманітними біологічними властивостями: антимікробними та антиадгезивними, включно із здатністю руйнування біоплівки [16].

1.2.1. Антимікробні властивості

Антимікробні властивості штаму IMB B-7241 зумовлені наявністю аміноліпідів, яким притаманна висока антимікробна активність. Експериментально визначено, що для підвищення їх синтезу у середовище додатково вносять дріжджовий автолізат та розчин мікроелементів. Крім того, так як НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа є ключовим ферментом біосинтезу аміноліпідів, для її активації до середовища можна додавати такі катіони, як:

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241			Літ.	Арк.	Акрушів		
Розробив	Благодир Д. О.									11	7	
Консульт.								Кафедра БТМ				
Керівник	Пирог Т. П.											
Н. Контр.												
Зав. каф.	Стабніков В. П.											

Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} у результаті відбувається синтез ПАР із вищою антимікробною активністю [15, 17].

Антимікробна активність ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, залежить від природи джерела вуглецю у середовищі культивування. Так у табл. 1.1 продемонстровано антимікробну дію ПАР штаму ІМВ В-7241, синтезованих на змішаній відпрацьованій олії, відходах виробництва біодизелю та очищеному гліцерині, на тест-культури: бактерій *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Enterobacter cloacae* С-8, *Bacillus subtilis* БТ-2; дріжджів *Candida albicans* Д-6, *C. utilis* ЕІ-8, *C. tropicalis* РЕ-2; мікроміцетів *Aspergillus niger* Р-3 і *Fusarium culmorum* Т-7 (табл. 1.1). Антимікробну активність визначали за показником мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) [17, 18].

Таблиця 1.1

Антимікробна активність поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на різних субстратах

Джерело вуглецю у середовищі культивування	Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) (мкг/мл) щодо									
	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida utilis</i> ЕІ-8	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	<i>Aspergillus niger</i> Р-3	<i>Fusarium culmorum</i> Т-7
Очищений гліцерин	3,8	0,24	3,8	0,48	0,96	1,9	1,9	3,8	0,06	0,03
Відходи виробництва біодизелю	15,2	0,96	7,6	3,8	3,8	15,2	7,6	7,6	3,8	1,9
Змішана відпрацьована олія	20	40	20	40	10	40	40	40	80	10

Відповідно до даних у табл. 1.1, були зроблені такі висновки:

➤ антимікробна активність розчинів ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, щодо дріжджових та бактеріальних тест-культур була у 2–8 разів, а щодо мікроміцетів у 60 разів нижчою порівняно з встановленою для ПАР, одержаних на очищеному гліцерині;

➤ ПАР, синтезовані на змішаній відпрацьованій олії, характеризуються нижчою антимікробною активністю розчинів ПАР, порівняно із МІК ПАР, синтезованих на гліцерині, щодо досліджуваних тест-культур [17, 18].

Таблиця 1.2

Антибактеріальна та антифунгальна активності ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за дії біологічних індукторів

Субстрат для синтезу ПАР	Біологічний індуктор	Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) (мкг/мл) щодо					
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	9,8	4,9	19,6	9,8	19,7	19,7
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,85	0,85	0,85	1,7	7,0	3,5
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,2	2,2	4,4	2,2	9,0	4,5
	Супернатант	4,6	2,3	18,4	4,6	18,4	9,2

Підвищення антимікробної активності ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих на токсичних промислових відходах виробництва біодизелю, можливо досягти внесенням у середовище культивування продуцента біологічних індукторів. У

статті [7] встановлено, що найефективнішими із тест-культур мікроорганізмів виявилися живі клітини бактерій *B. subtilis* БТ-2 (табл. 1.2), що характеризувалися високою антимікробною дією й до інших грампозитивних (*S. aureus* БМС-1) та грамнегативних (*Proteus vulgaris* ПА-12, *E. cloacae* С-8) бактерій, а також, найвищою антифунгальною активністю до дріжджів роду *Candida*. Водночас використання інактивованих клітин індуктора є більш доцільним саме з технологічної точки зору.

1.2.2. Антиадгезивні властивості

У якості тест-культур для визначення антиадгезивних властивостей ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на змішаній відпрацьованій олії, очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю, використовують мікроорганізми: *Leuconostoc mesenteroides* ПБ-7, *E. cloacae* С-8, *C. albicans* Д-6 (табл. 1.3) [17, 18].

Таблиця 1.3

Антиадгезивні властивості ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на різних субстратах

Матеріали	Тест-культури	Відсоток адгезії мікроорганізмів після обробки матеріалів розчинами ПАР, синтезованих на		
		очищеному гліцерині	відходах виробництва біодизелю	змішаній відпрацьованій олії
Кахель	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ПБ-7	21	85	–
	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	46	68	–
	<i>Candida albicans</i> Д-6	21	34	44
Сталь	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ПБ-7	23	80	–
	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	39	80	–
	<i>Candida albicans</i> Д-6	61	76	67
Лінолеум	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ПБ-7	26	54	–
	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	35	87	–
	<i>Candida albicans</i> Д-6	69	86	70

Примітка. «-» – дані відсутні. Концентрація ПАР у розчинах становила 5 мкг/мл.

Проаналізувавши дані з табл. 1.3, можна підсумувати, що ПАР, синтезовані на відходах виробництва біодизелю, характеризуються нижчою антиадгезивною активністю ніж на очищеному гліцерині. Якщо ж звернути увагу на відсоток адгезії дріжджів *C. albicans* Д-6, після обробки ПАР – на змішаній відпрацьованій олії, то він, також, є доволі низьким.

1.2.3 Руйнування біоплівки

Щодо руйнування біоплівки при дії розчинів ПАР, отриманих на попередньо зазначених субстратах, для порівняння було обрано дані статей [17-19] на прикладі бактерій *B. subtilis* БТ-2, *S. aureus* БМС-1, *E. coli* ІЕМ-1, *E. cloacae* С-8 (табл. 1.4), в яких зазначається, що максимальна деструкція біоплівки *E. cloacae* С-8 (47-58%) спостерігалася у разі використання нижчих концентрацій ПАР, отриманих на відходах виробництва біодизелю (62-124 мкг/мл), ніж синтезованих на відпрацьованій олії (116-233 мкг/мл). У той же час за таких концентрацій ПАР руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 становило 47-63% та 57-66% відповідно, а аналогічний ступінь деструкції досягався за вищих концентрацій ПАР (160-320 мкг/мл), синтезованих на очищеному гліцерині. За наявності ПАР, синтезованих на відпрацьованій олії (29-58 мкг/мл) руйнування біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 становило 83%, а у разі використання на порядок вищих концентрацій (320 мкг/мл) ПАР, одержаних на очищеному гліцерині, деструкція цієї біоплівки була майже у 2,5 рази нижчою.

Ці дані свідчать про те, що не тільки антимікробна (див. табл. 1.1) та антиадгезивна (див. табл. 1.2) активність ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, а й здатність до руйнування біоплівок залежить від природи ростового субстрату у середовищі культивування.

Руйнування біоплівки за наявності ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на різних субстратах

Джерело вуглецю в середовищі	Концентрація ПАР, мкг/мл	Руйнування (%) біоплівки			
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8
Очищений гліцерин	40	55	42	31	–
	80	58	56	33	–
	160	61	50	35	–
	320	63	54	35	–
Відходи виробництва біодизелю	15,5	–	–	–	25
	31	–	–	–	26
	62	–	–	–	47
	124	–	–	–	58
Відпрацьована олія	29	11	36	83	32
	58	19	38	42	47
	116	47	57	33	53
	233	63	66	25	55

Примітка. «-» – дані відсутні.

1.3. Біоремедіація нафтових та комплексних із важкими металами нафтових забруднень за дії ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Було встановлено, що через 30 діб ступінь очищення води від нафти (2,6 г/л) за наявності ПАР-вмісної культуральної рідини (5%, об'ємна частка) після вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на 2% гексадекані становив 92%, що зумовлено підвищенням біодоступності нафти за рахунок емульгувальних властивостей ПАР [20]. У статті [21] досліджено, що при додаванні ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як культуральної рідини до води, забрудненої нафтою (3 г/л) та важкими металами Cu^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+} (0,5; 0,1; та 0,1 ммоль відповідно), рівень деградації нафти досягав 92% через 20 днів.

При обробці забрудненого нафтою ґрунту (початкова концентрація нафти в ґрунті 21,4 г/кг) препаратами ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (культивування проводилося на 2% етанолі) ступінь її деструкції становив – 80-82%. Слід зазначити, що такий рівень очищення досягався саме при використанні ПАР-вмісної культуральної рідини, а не супернатанту, за наявності якого ступінь деструкції нафти становив всього

43%. Ці дані можуть свідчити про те, що у біодеградації нафти беруть участь і клітини *A. calcoaceticus* IMB B-7241, а не тільки поверхнево-активні речовини [20].

З метою підвищення показників синтезу ПАР під час росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на різних субстратах до середовища додавали 0,1-0,5 мМ Cu^{2+} . Як наслідок, було виявлено не лише підвищення кількості ПАР, а й ефективності розкладання комплексних із катіонами важких металів нафтових забруднень, що пояснюється активацією алкангідроксилаз, при культивуванні на вуглеводневих субстратах, які беруть участь в катаболізмі *n*-алканів. При рості на етанолі спостерігали активацію ферментів біосинтезу ПАР гліко- (фосфоенолпіруватсинтетаза) і аміноліпідів (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа), тому можна зробити припущення про можливе підвищення антимікробних та антиадгезивних властивостей ПАР, внаслідок утворення останніх. Окрім катіонів Cu^{2+} , дослідження були проведені із Cd^{2+} та Pb^{2+} , які при їх додаванні, показали нижчі ступені розкладання нафти.

Встановлено, що бактерії *A. calcoaceticus* IMB B-7241, окрім позаклітинних ПАР, здатні до синтезу фітогормонів ауксинової, цитокінінової та гіберелінової природи, використовуючи як субстрат змішану відпрацьовану олію [18]. Так у деяких випадках водна фаза, що залишилася після екстракції ПАР з супернатанту культуральної рідини, активізувала ріст клітин фітопатогенних бактерій. Відповідно до цього, їх можна використовувати для стимуляції росту мікроорганізмів та рослин [22].

Отже, на основі *A. calcoaceticus* IMB B-7241 можна створити комплексний препарат із різноманітними біологічними властивостями (поверхнево-активними, антимікробними, антиадгезивними, емульгувальними тощо) та стимулювальною дією (за рахунок фітогормонів) на різних субстратах, а в особливості на відходах промислового виробництва, який у найближчому майбутньому стане високо цінним продуктом не лише у грошовому еквіваленті, а й у природоохоронному плані, із широким спектром застосувань майже у всіх сферах індустрії, що вирішить одразу дві проблеми: першу – використання дешевої сировини для синтезу ПАР без попереднього очищення; другу – підвищиться утилізація відповідних відходів, за рахунок біоконверсії.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Із початком розвитку мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) постало питання у вирішенні такої задачі як дороговартісна сировина та енергоресурси для їх біосинтезу, що відповідно впливає на підвищення собівартості цільового продукту. На сьогодні, актуальною проблемою сучасності, особливо з екологічної точки зору, є біоремедіація забруднених нафтою, ксенобіотиками ґрунтів та вод [23, 24]. Також, сюди можна віднести проблему утилізації відходів переробки сільськогосподарської продукції (рослинні олії, відходи виробництва біодизелю). За даними статті [25], найбільш економічно вигідним та ефективним способом вирішення обох поставлених задач є біоконверсія відповідних промислових відходів у мікробні ПАР. Важливим є і те, що деякі штами-продуценти здатні використовувати ці субстрати без попередніх етапів очистки, що значно зменшить енергозатрати для отримання ПАР і відповідно ціну цільового продукту.

Так при виборі біологічного агента до уваги було обрано саме ті штами, які синтезують ПАР на токсичних промислових відходах (відходах виробництва біодизелю (очищених та неочищених), гліцерині як відходу виробництва мила та очищеній відпрацьованій олії). Особливістю ПАР, синтезованих штамом *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, є висока антимікробна активність за рахунок внесення у середовище культивування суспензії інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ-2, як біологічного індуктора, що дає можливість отримати високоефективні препарати ПАР на токсичних промислових відходах виробництва біодизелю [7]. На теперішній час вдалося знайти лише статтю 2014

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241			Літ.	Арк.	Акрушів		
Розробив	Благодир Д. О.									18	7	
Консульт.								Кафедра БТМ				
Керівник	Пирог Т. П.											
Н. Контр.												
Зав. каф.	Стабніков В. П.											

року, але новіших знайти не вдалося, яка містить інформацію як про синтез ПАР бактеріями *Pseudomonas aeruginosa* JVK1 (концентрація ПАР) на відходах виробництва біодизелю, так і про антимікробну активність цільового продукту. Антимікробна активність у даній статті визначали методом дифузії в агар, тобто за зонами затримки росту, які перебували в діапазоні 10-14 мм (малочутливі мікроорганізми) [12]. Отже, ПАР, синтезовані бактеріями *A. calcoaceticus* IMB B-7241, мають значно вищу антимікробну активність у порівнянні із ПАР *P. aeruginosa* JVK1. Дані, вказані у табл. 2.1, свідчать, що найбільшу кількість ПАР синтезують *P. aeruginosa* JVK1 (3,9 г/л), *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (3,6 г/л) та *B. subtilis* #309 (2,8 г/л), використовуючи гліцерин як відхід виробництва мила, проте тривалість культивування штамів і склад поживних середовищ є різним. Крім того, при культивуванні штаму *P. aeruginosa* JVK1 відходи підлягали попередньому очищенню, за допомогою 5 Н розчину NaOH, та висушуванню для видалення зайвої вологи, а при культивуванні штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241 – ні [12]. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента слід розрахувати вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів ПАР (табл. 2.2).

За даними, наведеними у табл. 2.2, середовище для культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є майже у 5 та 14 разів дешевшим, ніж для *B. subtilis* #309 і *P. aeruginosa* JVK1 відповідно. Проте тривалість культивування штамів *B. subtilis* #309, *P. aeruginosa* JVK1 є нижчою, ніж *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (ПАР) (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що кількість утворених ПАР за 1 год є найвищою у *B. subtilis* #309 та *P. aeruginosa* JVK1 (0,029 г/год), але умовна вартість ПАР, синтезованих штамом *A. calcoaceticus* IMB B-7241, є найнижчою (0,097 грн/г).

Таблиця 2.1.

Особливості одержання поверхнево-активних речовин різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація ПАР, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	Концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Відходи виробництва біодизелю (NH ₂) ₂ CO MgSO ₄ · 7H ₂ O NaCl Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O KH ₂ PO ₄ Дріжджовий автолізат Розчин мікроелементів*	50 мл 0,35 0,1 1,0 0,6 0,14 0,25 1,0 мл	168	3,6	Культивування у колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (t° = 30°C; n = 320 об/хв, pH = 7,0). Вносять суспензію інактивованих клітин біологічного індуктора <i>B. subtilis</i> БТ-2 – 2-2,5 мл/л, який вирощували на середовищі такого ж складу як і <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241, але у якості джерела вуглецю використовують 0,5% глюкози 24 год.	Пирог Т.П., Іванов М.С., Ярова Г.А. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів. <i>Наукові праці НУХТ</i> . 2021, 27(4): 43-52. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-4-6
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P1-1A	Очищена відпрацьована олія (NH ₄) ₂ SO ₄ NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O FeSO ₄ · 7H ₂ O Дріжджовий екстракт Розчин мікроелементів**	43,5 мл 6,5 13,5 1,0 3 1,2 0,2 0,002 0,5 0,5 мл	144	0,9	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 50 мл середовища на качалці (t° = 34,8°C; n = 200 об/хв, pH 7,7).	Moshtagh, B., Hawboldt, K., & Zhang, B. Biosurfactant production by native marine bacteria (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. <i>The Canadian Journal of Chemical Engineering</i> . 2021, 1-12. doi:10.1002/cjce.24254

Продовження табл. 2.1.

<i>Bacillus subtilis</i> #309	Гліцерин як відхід виробництва мила NH ₄ NO ₃ Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O	40,0 мл 4,0 5,0 2,0 0,2	96	2,8	Культивування у колбах об'ємом 100 мл з 30 мл середовища на качалці (t° = 37°C; n = 160 об/хв, рН 7,0).	Janek, T., Gudiña, E.J., Połomska, X., Biniarz, P., Jama, D., Rodrigues, L.R., etc. Sustainable Surfactin Production by <i>Bacillus subtilis</i> Using Crude Glycerol from Different Wastes. <i>Molecules</i> . 2021, 26(12): 3488. doi: 10.3390/molecules26123488
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Очищені відходи виробництва біодизелю K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ Дріжджовий екстракт Розчин мікроелементів***	20 мл 13,99 6,0 0,2 4,0 0,04% 1 мл	72	0,16	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 50 мл середовища на качалці (t° = 30°C; n = 180 об/хв).	Sousa, M. de, Dantas, I. T., Felix, A. K. N., Sant'Ana, H. B. de, Melo, V. M. M., Gonçalves, L. R. B. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633. <i>Brazilian Archives of Biology and Technology</i> . 2014, 57(2): 295-301. doi:10.1590/s1516-89132014000200019

Закінчення табл. 2.1.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WAE	Відходи виробництва біодизелю NaNO ₃ MSM [26]: K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ Розчин мікроелементів****	30,0 мл 20,0 2,27 0,95 0,67 2 мл	96	1,45	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 100 мл середовища на качалці (t° = 37°C; n = 180 об/хв, pH 7,0).	Eraqi, W. A., Yassin, A. S., Ali, A. E., & Amin, M. A. Utilization of Crude Glycerol as a Substrate for the Production of Rhamnolipid by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Biotechnology Research International</i> . 2016, 2016: 1-9. doi:10.1155/2016/3464509
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JBK1	Відходи виробництва біодизелю NaOH MSM [26]: K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ Розчин мікроелементів****	30,0 мл 200,0 2,27 0,95 0,67 2 мл	132	3,9	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 100 мл середовища на качалці (t° = 37°C; n = 180 об/хв, pH 7,0).	Bharali P., Singh S.P., Dutta N., Gogoi S., Bora L.C., Debnath P. etc. Biodiesel derived waste glycerol as an economic substrate for biosurfactant production using indigenous <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>RSC Adv</i> . 2014, 4(73): 38698-38706. doi:10.1039/c4ra05594b

Примітки. *Розчин мікроелементів – 1 мл, що містить (г/100 мл): ZnSO₄·7H₂O – 1,1; MnSO₄·H₂O – 0,6; FeSO₄·7H₂O – 0,1; CuSO₄·5H₂O – 0,004; CoSO₄·7H₂O – 0,03; H₃BO₃ – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) – 0,5.

**Розчин мікроелементів – 0,5 мл, що містить (г/л): ZnSO₄·7H₂O – 0,29; CaCl₂·2H₂O – 0,1; CuSO₄·5H₂O – 0,25; MnSO₄·H₂O – 0,4.

***Розчин мікроелементів – 1 мл, що містить (г/л): ЕДТА – 2,5; ZnSO₄·7H₂O – 10,95; FeSO₄·7H₂O – 5,0; MnSO₄·H₂O – 1,544; CuSO₄·5H₂O – 0,392; Co(NO₃)₂·6H₂O – 0,25; Na₂B₄O₇·10H₂O – 0,177.

****Розчин мікроелементів (г/л): Na₂ЕДТА·2H₂O – 6,37; ZnSO₄·7H₂O – 1,0; CaCl₂·2H₂O – 0,5; FeSO₄·7H₂O – 2,5; NaMoO₄·2H₂O – 0,1; CuSO₄·5H₂O – 0,1; CoSO₄·7H₂O – 0,2; MnSO₄·H₂O – 0,52; MgSO₄·7H₂O – 60,0.

Таблиця 2.2.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів ПАР

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)*
1	2	3	4	5	6
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Відходи виробництва біодизелю	50,0 (мл) 63,05 (г)	3,5	0,221	1
	(NH ₂) ₂ CO	0,35	37	0,0129	2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	13,6	0,0014	3
	NaCl	1,0	3,8	0,0038	4
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,6	30	0,018	5
	Дріжджовий автолізат	0,25	339,8	0,085	6
	KH ₂ PO ₄	0,14	24,1	0,0034	7
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,011	21	0,00023	8
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,006	23	0,000138	9
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001	4	0,4 · 10 ⁻⁵	10
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,4 · 10 ⁻⁴	3,7	0,15 · 10 ⁻⁶	11
	CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,0003	28,3	0,849 · 10 ⁻⁵	12
	H ₃ BO ₃	0,6 · 10 ⁻⁴	25	0,15 · 10 ⁻⁵	13
	KI	0,1 · 10 ⁻⁵	961,5	0,96 · 10 ⁻⁶	14
	ЕДТА	0,005	48	0,00024	15
	Вартість 1 л середовища – 0,35 грн				
<i>Bacillus subtilis</i> #309	Гліцерин як відхід виробництва мила	40,0 (мл) 50,44 (г)	22	1,11	16
	NH ₄ NO ₃	4,0	7,5	0,03	17
	Na ₂ HPO ₄	5,0	78	0,39	18
	KH ₂ PO ₄	2,0	24,1	0,048	7
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	13,6	0,0027	3
	Вартість 1 л середовища – 1,58 грн				

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JBK1	Відходи виробництва біодигезу	30,0 (мл) 37,83 (г)	3,5	0,132	1
	NaOH	200	23	4,6	19
	K ₂ HPO ₄	2,27	22,65	0,051	20
	KH ₂ PO ₄	0,95	24,1	0,023	7
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,67	10,5	0,007	21
	Na ₂ ЕДТА·2H ₂ O	0,013	76	0,001	22
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,002	21	0,42·10 ⁻⁴	8
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,001	18,2	0,182·10 ⁻⁴	23
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	4	0,2·10 ⁻⁴	10
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,0002	178,4	0,36·10 ⁻⁴	24
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0002	3,7	0,74·10 ⁻⁶	11
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,0004	28,3	0,113·10 ⁻⁴	12
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,00104	23	0,24·10 ⁻⁴	9
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12	13,6	0,0016	3
	Вартість 1 л середовища – 4,82 грн				

Примітки. * – Ціни наведено станом на січень 2022 р. 1 – <https://zaporozhskij-biotoplivnyj-zavod.uaprom.net/>, 2 – <https://www.systopt.com.ua/item-sechovyna>, 3 – <https://prom.ua/ua/p870196566-sulfat-magniya-vodnyj.html>, 4 – <https://prom.ua/ua/p272723101-sol-hlorid-natriya.html>, 5 – <https://flagma.ua/uk/dinatriyfosfat-natriy-fosfornokisly-o3272950.html>, 6 – <https://www.diam/catalog/reactive/mikrobiologicheskie-sredy-komponenty-dobavki-shtammy-mikroorganizmov/>, 7 – <https://alibaba.com/product-detail/kh2po4-chemical-name-industrial-grade-potassium-dihydrogen-phosphate-price-in-bulk-62129717365.html>, 8 – <https://flagma.ua/cink-sulfat-geptagidrat-7mi-vodny-o8382121.html>, 9 – <https://prom.ua/p582705996-marganets-sulfat-monogidrat.html?&primelead=MS4yNQ>, 10 – <https://flagma.ua/uk/zhelezny-kuporos-o1098352.html>, 11 – <https://armnet.by/p31671598-mednyj-kuporos-cuso4.html>, 12 – <https://alibaba.com/product-detail/high-purity-cobalt-sulfate-heptahydrate-cobalt-sulfate>, 13 – <https://prom.ua/ua/p1291301047-bornaya-kislota-roznychnye.html?&primelead=My4wMQ>, 14 – https://ekb.pulscen/products/kali_yodisty_19970857, 15 – <https://soda.kiev.ua/p83720927-trilon-edta-basf.html>, 16 – <https://flagma.ua/uk/glicerol-tehnicheskij-o7274750.html>, 17 – <https://flagma.ua/ammiachnaya-selitra-nitrat-ammoniya-nh4no3-o2100307.html>, 18 – <https://flagma.ua/uk/natriy-fosfornokisly-2-zameshchenny-bezvodny-o9380182.html>, 19 – <https://prom.ua/ua/p1061672212-soda-kausticheskaya.html>, 20 – https://alibaba.com/product-detail/dipotassium-hydrogen-phosphate-dkp-98-k2hpo4-60606530182.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.19ff1599w3Rvbb, 21 – <https://flagma.ua/sulfat-ammoniya-o5064967.html>, 22 – <https://prom.ua/p717787397-trilon-tetranatrievaya-sol.html>, 23 – <https://xn---utbcjbgv0e.com.ua/kaltsiy-khloristy-1-kg.html>, 24 – <https://alibaba.com/product-detail/price-of-sodium-molybdate-na2mo4-2h2o>.

Умовна вартість 1 г ПАР, синтезованих на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація ПАР, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР 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>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	3,6	168	0,021	0,35	0,097
<i>Bacillus subtilis</i> #309	2,8	96	0,029	1,58	0,56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JBK1	3,9	132	0,029	4,82	1,24

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 – 168 год, концентрація ПАР у культуральній рідині становить 3,6 г/л [7], а концентрація біомаси – 1,12 г/л.

Розрахунок вмісту у середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу ПАР. Як джерело вуглецю для одержання ПАР використовуються відходи виробництва біодизелю, а саме гліцеринова фракція. Вміст гліцерину у відходах становить 50,4 % [27].

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься у 3,6 г ПАР. Приймаємо, що у складі ПАР міститься 50 % вуглецю (як і у складі практично всіх органічних сполук). Отже, у 3,6 г ПАР міститься 1,8 г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах гліцерину міститься 1,8 г Карбону. Молекулярна маса гліцерину ($C_3H_8O_3$) – 92, із яких 36 г Карбону, а 1,8 г Карбону міститься у $(1,8 \times 92) / 36 = 4,6$ г гліцерину. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на гліцерині близько 50% субстрату окислюється до CO_2 для отримання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, тоді вміст гліцерину у середовищі становитиме $(4,6 \times 0,5) + 4,6 = 6,9$ г/л.

Оскільки вміст гліцерину у відходах виробництва біодизелю складає 50,4% [27], то для одержання 3,6 г ПАР, вміст відходів у середовищі повинен бути $(6,9 \times 100) / 50,4 = 13,7$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, тому вміст Карбону у 1,12 г біомаси становить $1,12 \times 0,5 = 0,56$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(0,56 \times 92) / 36 = 1,43$ г гліцерину. Враховуючи 50% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 1,12 г біомаси у середовище необхідно внести $(1,43 \times 0,5) + 1,43 = 2,15$ г/л гліцерину.

За перерахунком на відходи виробництва біодизелю одержимо 4,27 г/л.

Відповідно до чого, загальний вміст відходів виробництва біодизелю, необхідний для синтезу біомаси (1,12 г/л) та ПАР (3,6 г/л), становить $13,7 + 4,27 = 17,97$ г/л.

У складі середовища міститься 63,05 г/л відходів виробництва біодизелю, кількість яких є більшою ніж необхідно для синтезу біомаси та ПАР. Такий надлишок, порівняно із низьким вмістом джерела азотного живлення, є необхідним для високого синтезу ПАР, як вторинних метаболітів.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу аміноліпідів та біомаси. Так як вагомою перевагою бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є висока антимікробна активність за рахунок наявних у комплексі ПАР аміноліпідів, необхідна достатня кількість джерела азотного живлення для їх синтезу.

Розрахуємо кількість Нітрогену для їх синтезу на прикладі аміноліпиду відомого складу – сурфактину. Молекулярна маса сурфактину ($C_{53}H_{93}N_7O_{13}$) становить 1036, вміст Нітрогену в якому – 9-9,5%. Прийmemo, що у складі комплексу ПАР штаму IMB B-7241 міститься 15% аміноліпідів, тобто $3,6 \times 0,15 = 0,54$ г/л.

Далі розрахуємо вміст Нітрогену у 0,54 г/л аміноліпідів: $0,54 \times 0,095 = 0,05$ г Нітрогену. Відповідно до цього, кількість сечовини $((NH_2)_2CO)$ у середовищі повинна становити: $(60 \times 0,05) / 28 = 0,11$ г/л.

У складі середовища міститься 0,35 г/л сечовини, отже на біомасу буде витрачатися $0,35 - 0,11 = 0,24$ г/л сечовини, у якій міститься $(0,24 \times 28) / 60 = 0,112$ г/л азоту. Отже, із цієї кількості $(NH_2)_2CO$ може бути насинтезовано 1,1 г/л біомаси.

Синтез ПАР у залежності від співвідношення C/N

Було досліджено, що синтез ПАР, окрім умов культивування, залежить, також, від співвідношення C/N у середовищі. Так, наприклад, встановлено, що оптимальне співвідношення C/N для максимального синтезу ПАР (1,2 г/л) при культивуванні на

середовищі з етанолом 2% рівне 60:1 при концентрації сечовини 0,30 г/л, протягом 120 год [14]. Згідно із розрахунками вище, оптимальне співвідношення C/N для синтезу ПАР (3,6 г/л [7]) за умов культивування на середовищі з відходами виробництва біодизелю та концентрації сечовини 0,35 г/л, протягом 168 год буде становити 51:1 відповідно. При цьому кількість біомаси у обох варіантах становила 1,1-1,2 г/л. Отже, концентрація ПАР при культивуванні *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі з відходами виробництва біодизелю та концентрацією сечовини 0,35 г/л, при співвідношенні C/N, як 51:1, є вищою ніж на етанолі з концентрацією сечовини 0,30 г/л при співвідношенні 60:1 відповідно.

2.3. Морфолого-культуральні ознаки *A. calcoaceticus*

Бактерії *Acinetobacter calcoaceticus* (синонімічні назви: *Micrococcus calcoaceticus*, *Neisseria winogradskyi*, *Moraxella calcoacetica*) – це нерухомі кокобактерії (рис. 2.1), що забарвлюються за Грамом негативно у рожевий або червонуватий колір (рис. 2.2). У логарифмічній фазі росту розміри клітин становлять $1,0-1,5 \times 1,5-2,5$ мкм, а в стаціонарній – приймають переважну форму коків, які розташовуються попарно або у вигляді коротких ланцюжків. Інколи зустрічаються великі, непостійної форми клітини [28].

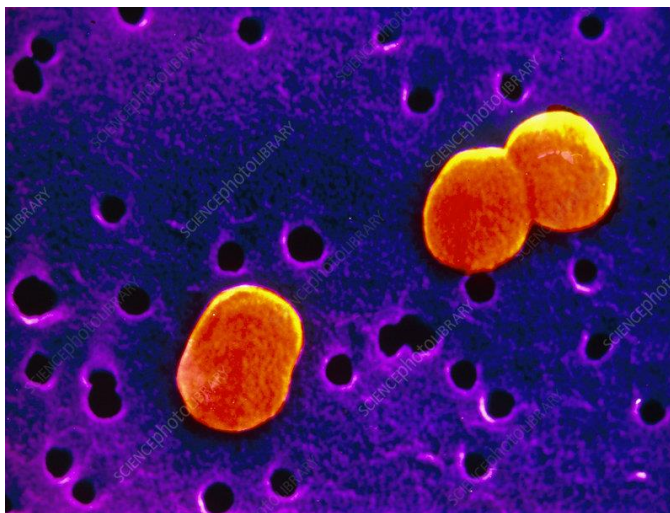


Рис. 2.1 Електронна мікрофотографія клітин *A. calcoaceticus* [29]

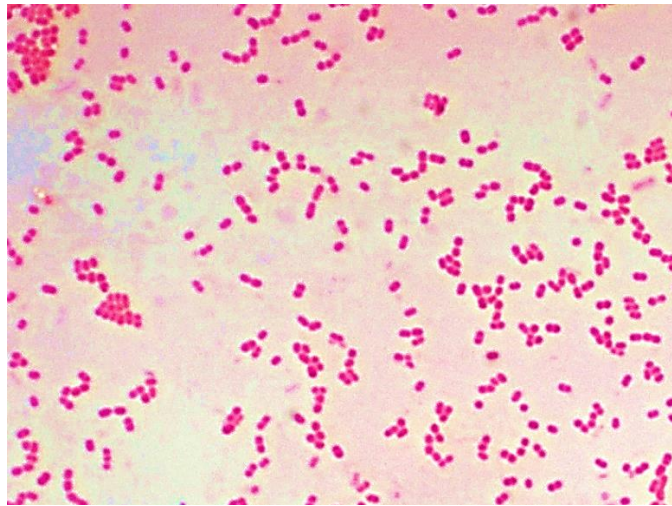


Рис. 2.2 Клітини *A. calcoaceticus*, забарвлені негативно за Грамом [30]

Даний вид бактерій не утворює спор, не має джгутиків, хоча інколи у деяких штамів на щільних агаризованих поживних середовищах може спостерігатися неприємна «смикаюча рухливість» за рахунок полярних фімбрій. Щодо капсули, то дана структура може бути присутньою не у всіх бактерій роду *Acinetobacter* (рис.2.3) [28].

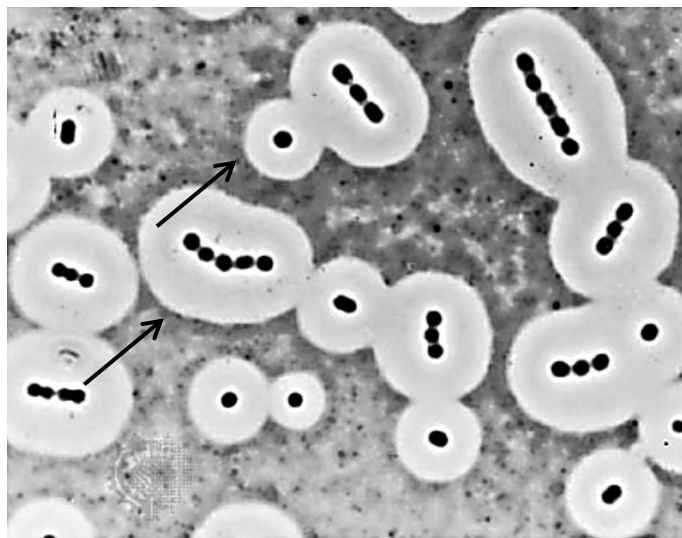


Рис. 2.3 Капсули бактерій виду *A. calcoaceticus* [31]

На кров'яному агарі колонії малі, мають сіру опуклу гладеньку форму, цілі краї, не викликають змін у крові (рис. 2.4). Культура *A. calcoaceticus* культивована при 30°C. Розмір колоній – 0,5-2 мм [32, 33].

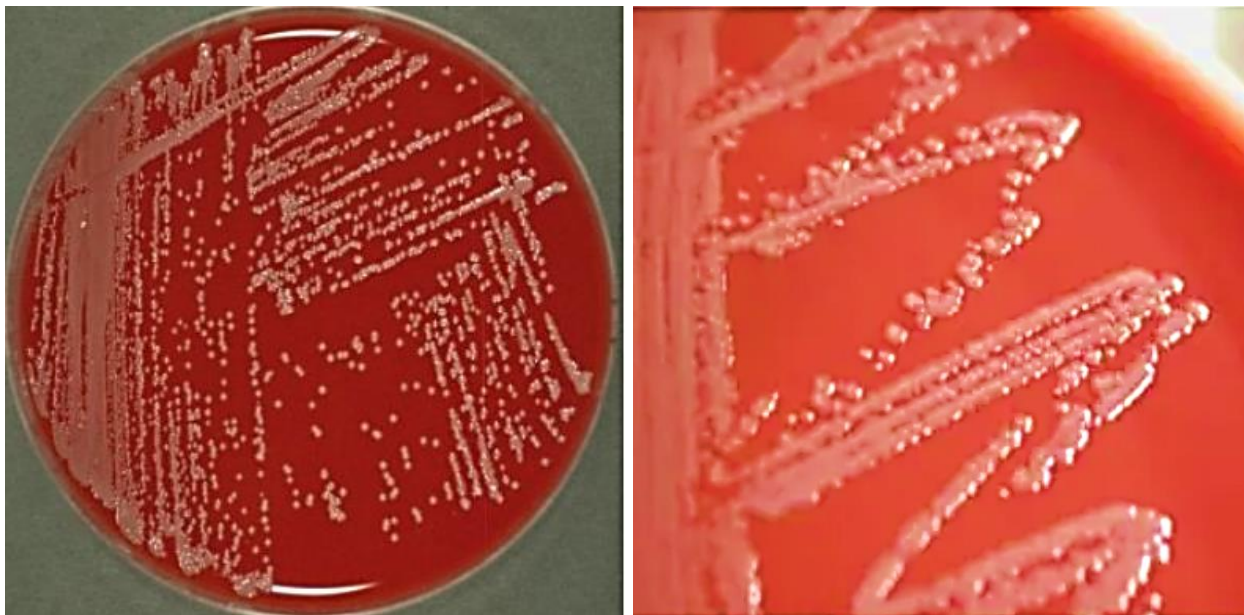


Рис. 2.4 Колонії *A. calcoaceticus* на кров'яному агарі [32]

Бактерії *A. calcoaceticus* здатні використовувати цеоліт, який додають у середовище з метою підвищення видалення ними фосфатів, що супроводжується, також, збільшенням біомаси. Клітини сильно адсорбуються і зчеплюються між собою за рахунок позаклітинних речовин (рис. 2.5) [34].

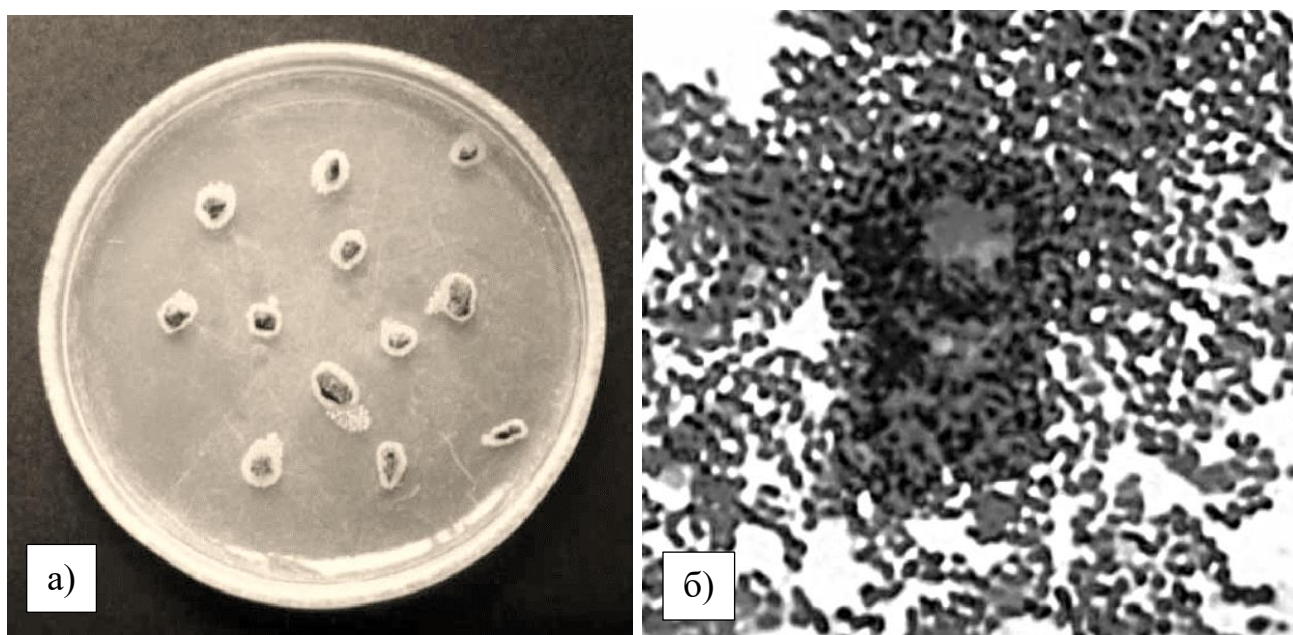


Рис. 2.5 Колонії (а) та клітини (б) *A. calcoaceticus*, вирощені на частинках природного цеоліту [34]

Для виділення бактерій роду *Acinetobacter* можуть бути застосовані широкі спектри стандартних лабораторних середовищ, включаючи живильний агар, триптиказний соєвий агар та агар МакКонкі. Крім того, використовують вже визначені

середовища на мінеральній основі із джерелом вуглецю з певною метою, наприклад, для отримання того чи іншого продукту або накопичувальної культури [35].

2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки *A. calcoaceticus*

A. calcoaceticus є облігатними аеробами. За типом живлення – хемоорганотрофи. Ці бактерії мають властивість використовувати різноманітні органічні субстрати як джерела вуглецю та енергії, не утворюють ацетоїн, індол, сірководень та оксидазу (за допомогою реактиву Ковача). У якості джерела азоту можуть споживати як амонійні, так і нітратні солі. Дають позитивні результати у тесті на каталазну активність, є переважно нітрат-негативними [28, 35]. Не здатні ферментувати лактозу [32]. Молекулярний вміст ГЦ у ДНК у бактерій роду *Acinetobacter* коливається від 39 до 47% [36].

Зазвичай, *A. calcoaceticus* є резистентним до пеніциліну. Варто відмітити, що даний рід у загальному плані володіє досить високим показником стійкості до різноманітних антибіотиків, хоча до левофлораксину, норфлораксину, тетрацикліну та доксицикліну характерна нижча стійкість для бактерій виду *A. calcoaceticus* [28].

Оптимальна температура росту становить 30-32 °С, а значення рН близько 7 [28]. Отже, можна зробити висновок, що по відношенню до температури *A. calcoaceticus* є мезофілом, а до рН – нейтрофілом.

2.5. Таксономічний статус біологічного агента *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Філогенетичну класифікацію для бактерій штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241 наведено відповідно до List of Prokaryotic with Standing in Nomenclature [37].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Gammaproteobacteria*

Порядок – *Pseudomonadales*

Родина – *Moraxellaceae*

Рід – *Acinetobacter*

Вид – *Acinetobacter calcoaceticus*

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Мікробні поверхнево-активні речовини є природними, біологічно розкладними та нетоксичними, і, як наслідок, попит на них на ринку постійно зростає [38].

3.1. Потреби населення України у поверхнево-активних речовинах для застосування у медицині

За статистичними даними, очікується, що розмір світового ринку синтетичних ПАР досягне складеного річного темпу зростання (CAGR) у 5,3% з 2020 по 2027 рік [39], тоді як для мікробних ПАР очікується зростання понад 7,5% (CAGR) між 2022 і 2032 роком [40].

Однією з властивостей мікроорганізмів є їх здатність адгезуватися на поверхні різних матеріалів і формувати біоплівку, небезпека утворення якої полягає в тому, що прикріплені мікробні клітини набувають резистентності до антимікробних препаратів, що за даними ВООЗ, є однією з найгостріших проблем не лише в Україні, а й в усьому світі. Пошук безпечних та ефективних засобів, які б перешкоджали даному процесу, є досить актуальним, а мікробні поверхнево-активні речовини можуть бути одними із потенційних продуктів у медичній галузі для вирішення цієї проблеми [6, 41].

Попит на мікробні ПАР для медичного використання в Україні залежить від багатьох факторів, таких як кількість медичних установ, обсяг медичних послуг, кількість населення, яке потребує медичної допомоги тощо. За даними Державної служби статистики України (<http://www.ukrstat.gov.ua/>), станом на 1 січня 2022 року в Україні було зареєстровано наступну кількість медичних установ – близько 74 750:

- загальна кількість закладів охорони здоров'я - близько 32 тисяч;
- лікарні - близько 1100;

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Благодир Д. О.				ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							31	10
Керівник	Пирог Т. П.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В. П.							

- поліклініки та інші амбулаторно-поліклінічні заклади - близько 19 тисяч;
- стоматологічні заклади - більше 5 тисяч;
- аптеки - більше 17 тисяч;
- санаторно-курортні заклади - більше 600;
- заклади донорства - більше 50.

Станом на 2022 рік, офіційно зареєстрована кількість населення в Україні становить більше 41,7 млн осіб (за даними Державної служби статистики України <http://www.ukrstat.gov.ua/>). На початку 2021 року було зафіксовано понад 11 тисяч випадків інфекцій, що викликалися антибіотикорезистентними штамми бактерій. Варто зазначити, що це значення може бути недооціненим, оскільки не всі випадки інфекцій можуть бути зареєстровані та відображені в статистиці. Загалом, кількість таких випадків в Україні за останні роки значно зростає і становить серйозну загрозу здоров'ю населення та громадському здоров'ю в цілому.

Ми пропонуємо використання мікробних ПАР як домішок до сучасних композиційних мийно-дезінфікуючих засобів, за допомогою яких буде здійснюватися поточне прибирання – дезінфекція поверхонь (підлоги та стін (кахлю)) у приміщеннях медичних закладів, а саме інфекційних лікарнях, оскільки це осередок, де існує великий ризик інфікування в результаті утворення біоплівки [42, 43].

3.2. Розрахунок потужності виробництва поверхнево-активних речовин для миття підлоги та стін (кахлю) у інфекційних лікарнях

На ринку України присутні як закордонні, так і вітчизняні виробники поверхнево-активних речовин. Однак, за даними аналітичних досліджень, більшість ПАР, які використовуються в Україні, імпортовані з інших країн, таких як Німеччина, США, Туреччина, Китай та інші:

1. BASF – німецька компанія, яка виробляє широкий спектр ПАР для застосування в багатьох галузях, включаючи харчову промисловість, фармацевтику, косметику, текстиль та інші [44].

2. Dow Chemical Company – американська компанія також виробляє ПАР для використання у харчовій промисловості, фармацевтиці, текстилі тощо [45].

3. Procter & Gamble – американська компанія, яка виробляє різні види ПАР для використання у своїх власних продуктах, таких як миючі засоби, шампуні, кондиціонери та інші [46].

4. Unilever – британо-голландська компанія, яка виробляє широкий асортимент ПАР для використання у своїх власних продуктах, таких як миючі засоби, косметичні засоби тощо [47].

5. Evonik Industries – німецька компанія, що виробляє різні види ПАР для використання в галузях харчової промисловості, фармацевтики, косметики, текстилю тощо [48].

Це пов'язано з тим, що закордонні виробники мають більшу досвідченість та технічну базу для виробництва ПАР високої якості. Крім того, більшість вітчизняних виробників зосереджені на виробництві спеціалізованих ПАР для конкретних галузей, таких як будівництво, сільське господарство, автомобільна промисловість тощо, тоді як закордонні виробники пропонують більш широкий асортимент.

Проте в останні роки вітчизняні виробники почали активно розвивати виробництво ПАР в Україні, що може привести до збільшення їх частки на ринку. Також, з метою підтримки вітчизняних виробників, деякі урядові програми надають пільги та допомогу для їх розвитку та модернізації виробничих потужностей.

Перелік декількох видів ПАР представлених на ринку України зазначено у таблиці 3.1:

Перелік декількох видів ПАР на ринку України

Поверхнево-активна речовина	Країна виробник	Об'єм/маса	Ціна, грн	Джерело інформації*
Лаурилсульфат натрію сухий (SLS 93%), додецилсульфат натрію (BASF)	Німеччина	1 кг	126	1
Моноізопропаноламін (MIPA) (Dow Chemical Company)	США	1 кг	291,6	2
Поліетиленгліколь Carbowax PEG 1450 (DOW Chemical)	Німеччина	1 кг	158	3
Віволт (Corteva)	США	1 л	1470	4
Фенол етоксилат (феноксіетанол) (Нафтолхим)	Україна	1 кг	90	5

Примітка. * – 1 - <https://prom.ua/ua/p1028455886-laurilsulfat-natriya-suhoj.html>; 2 - <https://tddiol.all.biz/uk/monoizopropanolamin-mipa-g16317272>; 3 - <https://tddiol.all.biz/uk/polietylenglikol-carbowax-peg-1450-dow-chemical-g27952488>; 4 - <https://posivna.com.ua/ua/poverhnevo-aktivni-rechovini/vivolt>; 5 - <https://naphtolchem.com.ua/ua/p1420477010-fenol-etoksilat-fenoksietanol.html>.

Проаналізувавши інформацію, на сьогодні в Україні виявлено виробників, які використовують у виробництві поверхнево-активних речовин лише штучно синтезовану сировину, тому виробництво комплексу ПАР, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ-2 як біологічного індуктора у середовищі культивування з відходами виробництва біодизелю, як ефективного препарату з високою антимікробною активністю вітчизняними виробниками є більш ніж доцільною, оскільки проблема антибіотикорезистентності розвивається швидкими темпами не тільки на території України, а й за її межами [7].

Зважаючи на те, що хімічні ПАР часто додаються як домішки до мийно-дезінфікуючих засобів, концентрація яких варіюється від 3 % до 5% [42], ми пропонуємо замінити їх нашими мікробними поверхнево-активними речовинами. Також, враховуючи, що кількість медичних установ в Україні є доволі великою і замінити усі антимікробні засоби ми не зможемо, візьмемо до уваги з даного переліку інфекційні лікарні, а для спрощення проведення відповідного розрахунку витрат мийно-дезінфікуючого засобу, до прикладу, оберемо Львівську обласну клінічну інфекційну лікарню [49], де буде умовно використовуватися мийно-дезінфекційний засіб для поточного прибирання приміщень – дезінфекції поверхонь (підлоги та стін (кахель)).

Для розрахунку витрат мийно-дезінфікуючих засобів для дезінфекції поверхонь під час проведення поточного прибирання скористаємося відповідною формулою:

$$X = Q \cdot (NK/100) \cdot S,$$

де Q – кількість дезінфекцій із розрахунку кількості робочих днів і кратності проведення дезінфекції згідно санітарних норм та правил; N – норма витрат дезрозчину на 1 м^2 у літрах (згідно Методичних вказівок щодо застосування засобу); K – концентрація дезрозчину; S (1) — площа приміщень, поверхонь тощо, що підлягає проведенню дезінфекції [43].

Відповідно до методичних вказівок для більшості мийно-дезінфікуючих засобів, кількість витрат робочого розчину становить 100 мл/м^2 [50]; згідно з Державними санітарними нормами та правилами «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я» у всіх приміщеннях медичних установ проводиться поточне прибирання не менше ніж один раз на день [51], а отже 365 разів; за даними інформаційно-аналітичної системи «Прозорро», загальна площа приміщень Львівської обласної клінічної інфекційної лікарні становить близько 31 тис. м^2 .

Отже, теоретична кількість витрат мийно-дезінфікуючого розчину на 1 рік для Львівської обласної клінічної інфекційної лікарні для проведення поточного прибирання становить:

$$X = 365 \cdot (0,1 \cdot 4/100) \cdot 31\,000 = 45\,260 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241, у якості домішок у засобі. Враховуючи мінімальні інгібуючі концентрації щодо мікроорганізмів за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за внесення у середовище культивування продуцента суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 як біологічного індуктора, кількість ПАР повинна становити у середньому $2,75 \text{ мкг/мл}$ ($0,275 \text{ г/л}$) [7]. Отже, на рік потрібно:

$$G_{\text{П}} = 45260 \cdot 0,275/1 = 12\,447 \text{ г} = 12,5 \text{ кг/рік}$$

Отже, для забезпечення Львівської обласної клінічної інфекційної лікарні антимікробним засобом із домішками ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 необхідно отримувати $12,5 \text{ кг}$ сухих поверхнево-активних речовин у рік.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Потужність нашого виробництва ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 становить 12,5 кг/рік. Продуцент – *A. calcoaceticus* IMB B-7241, за внесення у середовище культивування продуцента суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 як біологічного індуктора, синтезує 3,6 г ПАР на 1 л культуральної рідини [7].

Плануємо, що вибрану кількість цільового продукту будемо виробляти за $T_{рд} = 50$ робочих днів. Кількість циклів за рік становить:

$$N_{цк} = 24 \cdot T_{рд} / T_{цф} = 24 \cdot 50 / 79,5 = 15,1, \text{ а отже } 15 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, що включає тривалість виробничого біосинтезу (72 год) та час підготовки ферментера для роботи (7,5 год): миття та огляд апарата (1,5 год), його перевірка на герметичність (1 год), підігрів (0,5 год), безпосередньо стерилізація апарату (1 год), охолодження (0,5 год), а також завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год) й вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл складає:

$$G_{цк} = G_{нт} / N_{цк} = 12\,447 / 15 = 829,8 \text{ г/цикл.}$$

Об'єм культуральної рідини, який зливається за один цикл, із врахуванням суми втрат цільового продукту при виділенні (20 %):

$$V_{кр.} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{гп} / R_{кр}(1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 829,8 \cdot 0,95 / (3,6 \cdot (1 - 0,2)) = 301,1 \text{ л,}$$

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

Отже, протягом виробничого циклу отримують $V_{кр} = 301,1$ л культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини необхідно врахувати її втрати при краплиноності через колектор для відпрацьованого повітря, які складають від 10 до 15%.

301,1 л культуральної рідини ($V_{кр}$) можна синтезувати у ферментері, геометричний об'єм якого при $K_3 = 0,6$:

$$V_{мф} = V_{кр} / K_3 = 301,1 / 0,6 = 501,8 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер: $V_{ф} = 500$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{кр} / V_{ф} = 301,1 / 500 = 0,6,$$

де уточнений коефіцієнт перебуває у вибраних межах для аеробних процесів 0,55-0,65).

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у ферментері складатиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 301,1 / (1 + 0,1) = 273,7 \text{ л},$$

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

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 301,1 - 273,7 = 27,4 \text{ л}.$$

Для одержання 27,4 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати при крапливності через колектор для відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та інокуляту в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 27,4 / (1 - 0,1) = 30,4 \text{ л}.$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у інокуляторі буде складати:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 30,4 / (1 + 0,1) = 27,6 \text{ л},$$

де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для інокулятору.

Кількість інокуляту для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 30,4 - 27,6 = 2,8 \text{ л}.$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 30,5$ л можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 30,4 / 0,6 = 50,6 \text{ л}.$$

Беремо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 50$ л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап2} = V_{роб.2} / V_{сф} = 30,4 / 50 = 0,6.$$

Для одержання 2,8 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати при крапливності через колектор для відпрацьованого повітря, які складають від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та інокуляту у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 2,8 / (1 - 0,1) = 3,1 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у інокуляторі складатиме:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 3,1 / (1 + 0,1) = 2,8 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 3,1 - 2,8 = 0,3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 3,1$ л можна отримати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі з геометричним об'ємом:

$$V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 3,1 / 0,6 = 5,2 \text{ л.}$$

Беремо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 5$ л, а також уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап3} = V_{роб.3} / V_{сф} = 3,1 / 5 = 0,6.$$

Кількість інокуляту для засіву меншого інокулятора $V_{пм3} = 0,3$ л можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання даного інокуляту становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 300 / (750 \cdot 0,2) = 2.$$

Таким чином, для одержання інокуляту необхідно 2 качалочні колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 для забезпечення виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин у ферментері об'ємом 500 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

3.5. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2

Суспензія інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 вноситься у поживне середовище на стадії безпосереднього біосинтезу поверхнево-активних речовин, у робочий ферментер 500 л.

Для отримання 6 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати при краплевиносі через колектор відпрацьованого повітря, які складають від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та інокуляту у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 5,4 / (1 - 0,1) = 6 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу складає 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у апараті буде складати:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{па}) = 6 / (1 + 0,1) = 5,4 \text{ л,}$$

де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 6 - 5,4 = 0,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.1} = 6$ л можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{па1} = V_{роб.1} / K_{зап} = 6 / 0,6 = 10 \text{ л.}$$

Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10$ л, а також уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 6 / 10 = 0,6.$$

Кількість інокуляту для засіву меншого інокулятора $V_{пм1} = 0,6$ л можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання інокуляту становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм1} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 600 / (750 \cdot 0,2) = 4.$$

Таким чином, для отримання посівного матеріалу індуктора необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2 для внесення у середовище культивування продуцента для виробничого

біосинтезу ПАР здійснюється у посівному апараті на 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 та буде проходити у два етапи.

Підсумовуючи вище описану інформацію, для забезпечення Львівської обласної клінічної інфекційної лікарні, площею 31 тис. м², антимікробним засобом із домішками поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241, необхідно отримувати 12,5 кг сухих поверхнево-активних речовин в рік протягом 50 робочих трудоднів за 15 циклів біосинтезу, відповідно до чого приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 500 л, один інокулятор об'ємом 50 л, один інокулятор об'ємом 5 л. Для отримання суспензії інактивованих клітин біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2 приймаємо для встановлення 1 інокулятор об'ємом 10 л.

РОЗДІЛ 4

БІОТРАНСФОРМАЦІЯ РОСТОВОГО СУБСТРАТУ У ЦІЛЬОВИЙ ПРОДУКТ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у продуцента ПАР

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 є гліцерин [7]. Так як інформація щодо катаболізму гліцерину *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня, виконаємо її на основі наукових статей. Згідно із статтею [52] катаболізм гліцерину у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 відбувається шляхом активації ростового субстрату за участю АТФ до гліцерин-3-фосфату при дії ферменту гліцеролкінази (КФ 2.7.1.30), який окиснюється до дигідроксиацетонфосфату гліцерол-3-фосфатдегідрогеназою (КФ 1.1.1.8) із подальшою ізомеризацією під дією тріозофосфатізомеразою (КФ 5.3.1.1) у гліцеральдегід-3-фосфат, який виступає одним із центральних метаболітів гліколітичного окиснення глюкози.

Таким чином, утворений гліцеральдегід-3-фосфат залучається до гліколізу і перетворюється у 1,3-дифосфогліцерат за участю гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12), де останній за дії фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат. Далі дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. За дії енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват із подальшим перетворенням у піруват фосфоенолпіруватсинтазою (КФ 2.7.9.2), який залучається до подальшого метаболізму ферментами піруватдегідрогеназою K1 компонент (КФ 1.2.4.1) та піруватдегідрогеназою K2 компонент (КФ 2.3.1.12).

Схему катаболізму гліцерину наведено на рис. 4.1 [52].

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Благодир Д. О.				БІОТРАНСФОРМАЦІЯ РОСТОВОГО СУБСТРАТУ У ЦІЛЬОВИЙ ПРОДУКТ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							41	3
Керівник	Пирог Т. П.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В. П.							

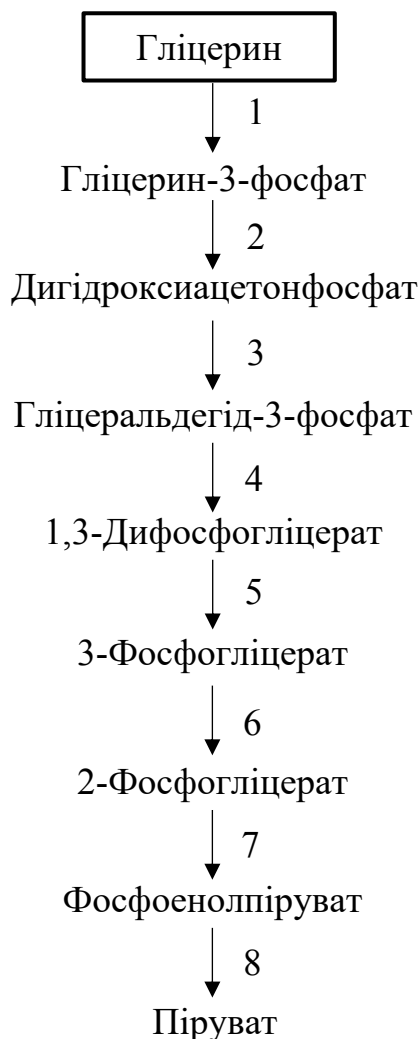


Рис. 4.1. Катаболізм гліцерину у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 згідно статті [52]

Ферменти: 1 – гліцеролкіназа (КФ 2.7.1.30); 2 – гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.8); 3 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 4 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 5 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 6 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 7 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 8 – фосфоенолпіруватсинтаза (КФ 2.7.9.2).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Цільовим продуктом бактерій *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 є комплекс поверхнево-активних речовин (ПАР), до складу якого входять: гліко- (трегалозомоно- і диміколати), аміно- та нейтральні (C_{13} – C_{18} -*n*-алканоли, C_{11} – C_{22} -*n*-алканові та міколові кислоти) ліпіди [16]. Під час росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із використанням відходів виробництва біодизелю як джерела вуглецю [7], внаслідок катаболізму гліцерину утворюється піруват, який окиснюється під дією ферментів

піруватдегідрогенази K1 компонент (КФ 1.2.4.1) та піруватдегідрогенази K2 компонент (КФ 2.3.1.12) до ацетил-КоА, залучаючи його далі до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [52].

Анаплеротичними реакціями, для забезпечення поповнення втрат інтермедіатів ЦТК, при рості на відходах виробництва біодизелю є фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксилазна реакція, яку каталізує фермент фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31), а не реакції гліюксилатного циклу, так як при рості *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на гліцерині активність ферменту ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) дуже низька (45 нмоль·хв⁻¹мг⁻¹ білка) [53].

Для утворення глюкозо-6-фосфату, функціонують реакції глюконеогенезу, ключовий фермент якого фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49), за дії якого оксалоацетат перетворюється на фосфоенолпіруват.

Глюкозо-6-фосфат при дії фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2) перетворюється на глюкозо-1-фосфат, із якого утворюється УДФ-глюкоза за допомогою ферменту УДФ-глюкозо-1-фосфатуридилілтрансферази (КФ 2.7.7.9). Утворена УДФ-глюкоза сполучається із глюкозо-6-фосфатом трегалозо-6-фосфатсинтетазою (КФ 2.4.1.15) для отримання трегалозо-6-фосфату.

3-Оксо-2-додеканоїлдокозанова кислота, необхідна для синтезу міколової кислоти (3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанова кислота), утворюється із ацетил-КоА кількома реакціями, дані про які поки не досліджені.

Міколова кислота, сполучаючись із синтезованим попередньо трегалозо-6-фосфатом, утворює трегалозо-6-фосфат-6-міколат із подальшим перетворенням на трегалозо-6-міколат. Приєднуючи ще один залишок міколової кислоти до трегалозо-6-міколату, синтезується трегалозо-6,6'-диміколат, які є представниками гліколіпідів у комплексі ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [52].

На сьогодні, реакції та ключові ферменти синтезу аміно- та нейтральних ліпідів, які, також, входять до комплексу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, не є вивченими і потребують подальших досліджень.

*Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт – формат А3 (додається).

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

5.1. Вибір умов і способу культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 – продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР)

Умови і спосіб культивування безпосередньо залежать від фізіолого-біохімічних особливостей біологічного агента.

1. Виробничий біосинтез і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 28-30°C і рН 6,8-7,0 [7]. За цих умов можливий ризик контамінування сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами. Через що необхідно забезпечити асептичні умови при отриманні ПАР. Для забезпечення асептичних умов проводять стерилізацію обладнання і комунікації, поживного середовища, аераційного повітря (оскільки *A. calcoaceticus* є аеробними бактеріями [28]), піногасників. Для перешкодження сторонній контамінації у ферментері створюють надлишковий тиск завдяки подачі стерильного аераційного повітря.

2. Виробництво ПАР зазвичай здійснюють періодичним способом. Так як ПАР є вторинними метаболітами, їх синтез розпочинається у стаціонарній фазі росту. Варто зазначити, що біосинтез ПАР може відбуватися одночасно із ростом продуцента, проте максимальна швидкість їх утворення досягається саме у стаціонарній фазі росту, тому при безперервному культивуванні продуктивність біосинтезу буде знижуватися. Зважаючи на дані нюанси, обираємо періодичний спосіб культивування.

3. Для культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 обираємо глибинний спосіб культивування, оскільки він має переваги над поверхневим: легко піддається механізації та автоматизації. Під час глибинного способу культивування компоненти поживного середовища споживаються раціональніше, адже

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Благодир Д. О.				ОБҐРУНТУВАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							44	39
Керівник	Пирог Т. П.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В. П.							

клітини культури рівномірно розташовуються по всій товщі середовища, що дозволяє зменшити кількість відходів виробництва.

Отже, культивування продуцента поверхнево-активних речовин здійснюється періодично, глибинним способом за аеробних умов при дотриманні асептики проведення процесу.

5.2. Вибір умов і способу культивування *Bacillus subtilis* БТ-2 – біологічного індуктора

Умови та спосіб культивування цілком залежать від фізіолого-біохімічних особливостей біологічного індуктора.

1. Отримання культуральної рідини і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 28-30°C і рН 6,8-7,2. За таких умов можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами. Тому необхідно забезпечити асептичні умови під час отримання культуральної рідини. Для забезпечення асептичних умов проводять стерилізацію обладнання і комунікації, поживного середовища, аераційного повітря. Для попередження сторонньої контамінації у ферментері створюють надлишковий тиск за допомогою подачі стерильного аераційного повітря.

2. Для культивування індуктора обираємо глибинний спосіб культивування, оскільки він широко використовується для отримання біомаси мікроорганізмів, адже клітини культури рівномірно розташовуються по всій товщі середовища, відповідно його компоненти споживаються раціональніше.

Отже, культивування біологічного індуктора здійснюється глибинним способом в аеробних умовах при умові дотримання асептики проведення процесу.

5.3. Вибір типу ферментера для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 – продуцента ПАР

Відповідно до умов культивування біологічного агента конструкція і оснащення ферментера може різнитися. Обравши спосіб культивування та визначивши фізіолого-біохімічні особливості продуцента, обираємо потрібне обладнання для ферментера, що забезпечило б створення даних умов.

1. Під час культивування індуктора необхідними є аеробні умови. Тому ферментер повинен бути обладнаний барботером із метою забезпечення культури необхідною кількістю кисню.

2. Враховуючи, що процес ферментації має проходити за нейтрального значення рН (6,8-7,0), тоді ферментер повинен бути обладнаний датчиком для контролю значень рН.

3. Оскільки ферментація має проходити при постійній температурі (28-30°C), тоді ферментер має бути оснащений сорочкою і датчиком, який відображатиме значення температур.

4. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач пристрій. Оскільки культивування продуцента ПАР здійснювалося у колбах на качалці [7], і встановлення перемішувача пристрою певної особливої конструкції і типу не зазначено для виробничого культивування, то він обирається довільно. Оберемо турбінну мішалку для найбільш ефективного перемішування.

5. При використанні як субстрату відходів виробництва біодизелю оснащення ферментера додатковим піногасником не є необхідним. Оскільки відходи, окрім гліцерину, містять у складі такі компоненти як: жирні кислоти, олеати, тригліцериди [27], піна під час процесу ферментації утворюватися не буде.

Щодо замовлення із приводу виробництва ферментера на 500 л із заданими параметрами можна звернутися до фірми «Bioengineering AG» (Швейцарія). Дана фірма випускає ферментери об'ємом від 2 л до 500 м³, особливістю яких є їх модульна система, установку якої можна легко розширювати та адаптувати під специфічний процес завдяки аксесуарам та комплектуючим свого ж виробництва.

Ферментери фірми «Bioengineering AG» гарантують легку змінність насадок та додаткового обладнання для подачі поживного середовища, аерації, додавання кислоти/лугу, піногасіння, відбору проб та продукту, автоматичною системою мийки і стерилізації CIP/SIP для забезпечення асептичних умов при експлуатації ферментерів. Вони містять вбудовані датчики рН, рО₂, окислювально-відновного режиму, температури, піногасіння, забезпечуючи повний контроль процесу ферментації. Залежно від комплектації ферментери можуть працювати у періодичному або

безперервному режимі, із та без підживлення. Різноманітні перемішувачі пристрої (імпелер Раштона, гвинтовий пропелер) і системи аерації (барботери, безбульбашкова аерація через силіконові трубочки) дозволяють використовувати один і той же ферментер під потреби різних культур [54, 55].

5.4. Вибір типу ферментера для культивування *B. subtilis* БТ-2 – біологічного індуктора

Залежно від умов культивування біологічного індуктора конструкція і оснащення ферментера різнитиметься. Обравши спосіб культивування та визначивши фізіолого-біохімічні властивості бактерій *B. subtilis* БТ-2, оберемо необхідне обладнання для ферментера для створення даних умов.

1. Під час нарощування біомаси індуктора необхідним є створення аеробних умов. Відповідно до чого ферментер повинен бути оснащений барботером із метою забезпечення культури необхідною кількістю кисню.

2. Так як процес ферментації має проходити за нейтрального значення рН (6,8-7,0), тоді ферментер має бути оснащений датчиком для контролю даних значень рН.

3. Оскільки ферментація має проходити при постійній температурі (28-30°C), то ферментер повинен мати сорочку і датчик, що відображатиме значення температур.

4. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач пристрій. Оскільки встановлення перемішувача пристрою певної особливої конструкції і типу не зазначено для виробничого культивування, то він обирається довільно. Оберемо турбінну мішалку для найбільш ефективного перемішування.

Щодо замовлення із приводу виробництва ферментера на 10 л із заданими параметрами можна також звернутися до фірми «Bioengineering AG», згідно із характеристикою, описаною у підрозділі 5.3.

5.5. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 – продуцент поверхнево-активних речовин (ПАР) – по відношенню до кисню є облигатним аеробом [28], тому процеси вирощування посівного матеріалу та безпосередньо виробничого біосинтезу повинні бути забезпечені системою безперервної подачі стерильного аераційного повітря

через барботер для аерації культуральної рідини. Так як під час виробничого культивування передбачається внесення суспензії інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ-2 як біологічного індуктору, необхідно також забезпечити подачу стерильного аераційного повітря на стадії вирощування посівного матеріалу. Відповідно до цього, важливою допоміжною роботою є одержання достатньої кількості стерильного повітря для аерації продуцента та індуктора, що слід передбачити у технологічній схемі.

При отриманні посівного матеріалу у колбах на качалці підготовка аераційного повітря як такого не здійснюється, тому роль так званого фільтрувального матеріалу у даному випадку виконує ватно-марлевий корок.

Підготовка стерильного аераційного повітря для культивування у посівних апаратах та виробничому ферментері проходить у кілька етапів.

Забір атмосферного повітря. Забір повітря здійснюють повітродувкою на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі, оскільки із збільшенням висоти над поверхнею концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується. Враховуючи висоту ферментера об'ємом $0,5 \text{ м}^3 - 2,6 \text{ м}$ [56], а також висоту поверху – 6 м, косий дах будівлі $\sim 1,5 \text{ м}$, забір повітря виконують на висоті $\sim 10 \text{ м}$ [57].

Очищення повітря від пилу на магістральному фільтрі високого тиску грубого очищення. Для звільнення повітря від абразивних часток, пилу, які в подальшому можуть пошкодити компресійне обладнання, його подають на магістральний фільтр високого тиску грубого очищення. Усередині якого у якості фільтруючого матеріалу використовують акрилові волокна, застосування якого забезпечує високий ступінь очищення повітря від пилу та твердих частинок за відносно невисокого опору. Акрилові волокна характеризуються високою термостійкістю (до 250°C) та міцністю, а також володіють надзвичайною стійкістю до гідролізу, плісняви та бактерій, на відміну від природних волокон. Їх встановлюють перед повітродувкою, і як наслідок, попереджається потрапляння часток розміром більше 3 мкм. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$ [58, 59].

Компресування (стиснення) повітря. Для подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях фільтрування, а також подолання гідравлічного опору під час диспергування повітря у об'ємі культуральної рідини, його піддають стисненню у турбокомпресорі до 0,35-0,5 МПа, що призведе до підвищення

температури до 120–250°C і вологовмісту на один об'єму [59]. Таким чином, ми збільшуємо об'єм подачі повітря за рахунок підвищення його щільності.

Стабілізація термодинамічних показників. Враховуючи попередні параметри, при виході повітря з компресора необхідне його охолодження до оптимальної температури культивування (25-30°C) за допомогою пластинчастого теплообмінника.

Крапельна волога, що утворюється під час охолодження уловлюється та у вигляді конденсату виводиться, оскільки надлишкова вологість призводить до конденсації парів води і змочування частинок фільтрувального матеріалу, що може слугувати фактором утворення цвілі, а також розвитку сторонньої мікробіоти. Крім того, може зменшуватися ефективність фільтрування й збільшуватися опір матеріалу потоку повітря.

Для видалення залишкової конденсованої вологи, вирівнювання тиску та стабілізації потоку повітря подають у ресивер. Вологість повітря становить 60%. Під час проходження повітря через ресивер за рахунок його великої площі тепло розсіюється, тому необхідно здійснити підігрів повітря у теплообмінниках (45-50°C) [57, 59].

Очищення повітря на магістральному фільтрі високого тиску головного очищення. Повітря, що подається до усіх посівних апаратів та виробничого ферментеру цеху, потрапляє в магістральні повітряні фільтри високого тиску головного очищення, які також заповнюються акриловими волокнами, але з товщиною волокон 1 мкм, що забезпечує вищу ефективність пилосбору. Дане волокно можна стерилізувати гострою парою, на відміну від перхлорвінілового, яке стерилізують за допомогою хімічних газів. Ступінь очищення становить 98% [58, 59].

Очищення повітря на магістральному фільтрі високого тиску індивідуального очищення. Перед безпосередньою подачею повітря в апарат, воно надходить через колектори від головних фільтрів на індивідуальні надвисокоєфективного очищення, встановлені перед кожним посівним апаратом та ферментером, які забезпечують вловлювання механічних та мікробних часток, пропущених при роботі інших фільтрів, а також тих, що потрапили до системи випадково та мають розмір менше 0,1 мкм. Як фільтруючий матеріал використовується боросилікатне мікрОВОлокно, відмінною особливістю якого є висока швидкість потоку з низькою втратою тиску, а

також можливість стерилізації гострою парою за рахунок термостійкості до 500 °C [58, 60]. Гофрована тканина Петрянова теж володіє високою ефективністю стерилізації повітря, проте характеризується швидким псуванням при змочуванні, що вимагає вживання заходів для захисту тканини від змочування конденсатом пари у процесі стерилізації [57]. Ефективність очищення становить 99,999% [58].

5.6. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва поверхнево-активних речовин

Забезпечення чистоти та асептики на усіх етапах технологічного циклу є ключовою передумовою якісних показників продукції, так як сторонні мікроорганізми, споживаючи поживні речовини і виділяючи при цьому власні метаболіти, гальмують ріст та змінюють оптимальні умови розвитку основної культури, при цьому значно ускладнюється виділення цільового продукту та відповідно знижується його якість. Оскільки вирощування посівного матеріалу продуцента *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та біологічного індуктора *Bacillus subtilis* БТ-2, а також безпосередньо виробничий біосинтез повинні проходити у асептичних умовах, відповідно до цього обов'язковою складовою підготовчих робіт при даному виробництві є проведення робіт санітарно-гігієнічного призначення з метою забезпечення мінімальної кількості контамінантів у всіх учасників виробничого процесу, а саме: аераційного повітря, поживних середовищ, обладнання, яке перебуватиме у безпосередньому контакті з культуральною рідиною, виробничі приміщення та персонал.

Санітарна підготовка виробництва включає кілька етапів:

- ✓ підготовка персоналу (навчання та контроль знань);
- ✓ підготовка виробничих приміщень (обробка мийними та дезінфікуючими засобами) для зниження рівня загального забруднення та мікробної контамінації;
- ✓ підготовка обладнання, яке проходить багатостадійну обробку (миття, дезінфекцію, ополіскування та стерилізацію), перевірку на герметичність;
- ✓ підготовка комунікацій (миття, стерилізація) [59].

Враховуючи, що виконання робіт санітарно-гігієнічного призначення включає у себе стадії миття та дезінфекції об'єктів, доречно було б об'єднати їх, використовуючи мийно-дезінфікуючі засоби, виключаючи при цьому використання розчинів мийних засобів. Крім того, зважаючи на значні об'єми обладнання та поверхонь на

виробництві у процесі масової обробки, варто віддавати перевагу дешевим і ефективним мийно-дезінфікуючим засобам із широким спектром дії, а також важливою вимогою є низька токсичність та алергенність для організму людини [59].

Рекомендується чергувати дезінфекційні засоби кожні 1-3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких штамів мікроорганізмів [61].

Характеристика обраних мийно-дезінфікуючих засобів для миття та дезінфекції обладнання, виробничих приміщень та комунікацій наведені у табл. 5.1:

Таблиця 5.1

Характеристика мийно-дезінфікуючих засобів для виробництва ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

№	Назва мийно-дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість засобу, грн/л(кг)	Опис та властивості мийно-дезінфікуючого засобу	Джерело інформації*
	1	2	3	4	5	6
1	«Стериокс» (надоцтова кислота – 2,0-15,0 %) [62]	Обладнання, поверхні обладнання, стіни, підлога, вікна, двері	0,25	125 (л)	– Виробник: «BALTIACHEMI OU», Естонія. – Прозорий розчин, від безбарвного до світло-жовтого кольору із характерним запахом оцтової кислоти. Засіб добре змішується з водою. Робочі розчини не пошкоджують об'єкти виготовлені з нержавіючої сталі, луженого заліза, алюмінію, скла, гуми тощо. Розчини засобу не піняться, видаляють механічні та залишкові білкові та жирові забруднення, не фіксують органічні забруднення, добре змиваються, не залишають наліт. Ефективні за температури + 4-50 °С , при підвищенні біоцидні властивості розчинів зростають, рН < 1,0. – Засіб екологічно безпечний. У концентрованому вигляді при попаданні у шлунок належить до помірно небезпечних речовин (3-й клас), при інгаляційного впливі (2-ий клас небезпеки). Не має сенсibilізуючих властивостей. Може подразнювати слизові органів дихання та очей. – Спектр антимікробної дії: бактерицидні, туберкулоцидні, фунгіцидні, віруліцидні, спороцидні властивості. – Термін придатності – 1 рік. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці за температури не вище +25 °С у критому, добре провітрюваному приміщенні, окремо від джерел вогню, тепла, прямого сонячного світла, легко займистих матеріалів.	1

	1	2	3	4	5	6
2	«Бактодез (Bactodez)» (дидецилдиметила- моніум хлорид – 14,0%) [63]	Поверхні об- ладнання, стіни, підлога, вікна, двері	5	93 (л)	– Виробник: ТОВ «Бланідаз», Україна. – Робочі розчини мають виражені миючі, емульгуючі та дезодоруючі властивості. Також не викликають корозії металів, не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із корозійно-стійких і нестійких до корозії металів, термостабільних та термолабільних матеріалів, скла, гуми тощо. Не пошкоджують поверхні з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, не залишають нальоту і плям. – Спектр антимікробної дії: бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні властивості. – Термін придатності – 3 роки. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці за температури від 0 °С до + 40 °С у критих неопалюваних складських приміщеннях, які захищені від вологи, прямого сонячного проміння та джерел вогню.	2

	1	2	3	4	5	6
3	«Санітаб (Sanitab)» (трихлорізоціану- рова кислота – 55,0%) [64]	Поверхні об- ладнання, стіни, під- лога, вікна, двері	0,3	185 (кг)	– Виробник: ТОВ «Бланідаз», Україна. – Таблетки білого кольору (допускаються відтінки та вкраплення) круглої форми гранул, вагою $3,2 \pm 0,2$ г, які добре розчиняються у воді. Робочі розчини засобу володіють антикорозійними, стабілізуючими властивостями, пом'якшують воду, мають змочувальні, емульгуючі, високі мийні властивості, не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійно стійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, не фіксують забруднення органічного походження на поверхні, добре змиваються, не залишають нальоту. – Засіб не належить до категорії горючих речовин, проте є вибухонебезпечним. За гострою токсичністю при введенні у шлунок належить до помірно небезпечних речовин (3 клас), при інгаляції та при нанесенні на шкіру належить до мало небезпечних речовин (4 клас). Не має сенсibilізуючих властивостей, мутагенного, тератогенного та канцерогенного впливу. – Спектр антимікробної дії: бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні властивості. – Термін придатності – 5 років. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці за температури від -25°C до $+40^{\circ}\text{C}$ у критих неопалюваних складських приміщеннях, які захищені від вологи та прямого сонячного проміння.	3

	1	2	3	4	5	6
4	«Фамідез® комбі» (алкілдиметилбензи- ламонію хлорид- 16,0%; алкілпропі- лендіамін-1,5-бісгу- анідин ацетат – 9,2%) [65]	Поверхні об- ладнання, стіни, під- лога, вікна, двері	1	374 (л)	– Виробник: ТзОВ «ДезоМарк», Україна. – Прозора рідина блакитного або зелено-блакитного ко- льору. Мас помірний специфічний запах. Добре розчиня- ється у воді. Робочі розчини не пошкоджують об’єкти, які виготовлені із корозійностійкого металу, гуми, дерева, ка- хлю, порцеляни та поверхні з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруд- нення на поверхні, добре змиваються, не залишають наліт. Засіб не сумісний з аніонними та неіоногенними поверх- нево-активними речовинами, милами і окисниками. – Не містить фенолів та альдегідів. За гострою токсичні- стю при введенні у шлунок є помірно небезпечними речо- винами (3 клас) та до мало небезпечних речовин при нане- сенні на шкіру (4 клас безпеки). У нативній формі та кон- центрованих розчинах подразнює слизову оболонку очей. Не виявляє сенсibiliзуючих властивостей. – Спектр антимікробної дії: бактерицидні, туберкулоцидні, фунгіцидні, віруліцидні властивості. – Термін придатності – 3 роки. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці за температури не вище + 35 °С у критих неопалюваних складських приміщеннях, які захи- щені від вологи та прямого сонячного проміння, від джерел вогню.	4

Продовження табл. 5.1

	1	2	3	4	5	6
5	«КлінДез 401» («Clean&Dez 401») (натрію гіпохлорит- 50,0% (вміст актив- ного хлору 5,0%- 9,0%) [66])	Обладнання, стіни, під- лога, вікна	0,5	70 (л)	– Виробник: ТЗОВ «НБК УКРАСЕПТИКА», Україна. – Концентрат жовтуватого кольору з характерним запахом хлору. При зберіганні засобу можливе випадіння осаду, що не впливає на якість дезінфікуючих властивостей засобу. Робочі розчини засобу мають антикорозійні, стабілізуючі, змочувальні, емульгуючі та мийні властивості. Не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійкого металу (нержавіючої сталі, заліза, алюмінію), скла, гуми, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують забруднення органічного походження на поверхні, добре змиваються, не залишають нальоту. – Засіб не належить до категорії горючих речовин, проте є вибухонебезпечним. За параметрами гострої токсичності при введенні у шлунок та нанесенні на шкіру є мало небезпечними речовинами (4 клас). Спричиняє слабку місцево-подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки очей. Не виявляє сенсibilізуючих властивостей, мутагенного, тератогенного та канцерогенного впливу. – Спектр антимікробної дії: бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні властивості. – Термін придатності – 3 роки. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці у затемненому місці у тарі зі щільно закритою кришкою.	5

	1	2	3	4	5	6
6	«ДЕЗОлайт» (дидецилдиметил- амоній хлорид у ме- жах 7,0 - 8,0%; алкі- лдиметилбензиламо- ній хлорид у межах 6,0 - 7,0%) [67]	Поверхні об- ладнання, стіни, під- лога	4	300 (л)	– Виробник: ТОВ «Гігієна Дез», Україна. – Рідкий прозорий безбарвний або жовтуватий концентрат зі слабким специфічним запахом запашки. Розчин 1,0% за- собу має рН = 10,5±2,0. Добре розчинний у воді і піниться при збовтуванні. Робочі розчини мають мийні властивості, не спричиняють корозії виробів з металу, не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із металу, скла, полімерних мате- ріалів, дерева, кахлю та поверхні з лакофарбовим та полі- мерним покриттям; не фіксують білкові забруднення, до- бре змиваються, не залишають наліт. – Засіб є пожежо- і вибухобезпечним, зберігає свою актив- ність після заморожування. За параметрами гострої токсич- ності при введенні в шлунок є речовинами 3 класу небез- печних речовин та до 4 класу мало небезпечних речовин за ступенем леткості. Алергенні властивості не виявлено. – Спектр антимікробної дії: бактерицидні, фунгіцидні, ту- беркулоцидні, віруліцидні властивості. – Термін придатності – 3 роки. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці у сухому прохолодному примі- щенні, яке віддалене від джерел відкритого вогню та захи- щене від дії прямих сонячних променів за температури від 0 °С до +35 °С.	6

Примітки. * – Ціни наведено станом на лютий 2023 р. 1 – <https://astra-life.com/ua/p495564696-sterioks-skidka-kazhdomu.html>; 2 – <https://dom-online.com.ua/ua/p1449546876-baktodez-sredstvo-dlya.html>; 3 – <https://dental-club.com.ua/ua/p887054766-sanitab-kontejner-300.html>; 4 – <https://medmelochi.com.ua/p960891919-famidez-kombi.html>; 5 – https://www.mpi-dpr.com.ua/na-golovnu/70-381-klindez-401-dezinfekciya-pso.html#/6-cina-5_1; 6 – <http://antiseptica.com.ua/dezinfekcija/instrumenty/dezolajt.html>.

5.7. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва поверхнево-активних речовин

Виробництво поверхнево-активних речовин (ПАР) *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюється упродовж 50 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 500 л, інокулятор об'ємом 50 л, лабораторний інокулятор об'ємом 5 л для культивування продуцента ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, а також лабораторний інокулятор об'ємом 10 л для культивування біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2, реактори та збірники для підготовки компонентів поживного середовища, качалки, бокс та лабораторне обладнання.

Виробництво включає такі цехи: цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту, качалочна кімната та лабораторні приміщення, де знаходяться автоклави, центрифуги, бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю. Відстань між стінами й апаратами становить приблизно 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісним обладнанням складає 1 метр (рис. 5.1) [68].

Габаритні розміри основного обладнання представлено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	500	1,2	2,6
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу	500	1,2	2,0
Реактор-змішувач для відходів виробництва біодизелю	25	0,45	0,65
Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину дріжджового автолізу	3	0,42	1,2
Інокулятор	50	0,7	1,7
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в інокуляторі	50	0,8	1,6
Лабораторний ферментер	5	0,66	1,6
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування у лабораторному ферментері	5	0,66	0,94
Лабораторний ферментер	10	0,35	0,5
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування у лабораторному ферментері	10	0,66	1,6
Всього	1 158		

За даними табл. 5.2, загальний об'єм апаратів для вирощування посівного матеріалу продуцента й індуктора, а також виробничого біосинтезу становить 1,158 м³.

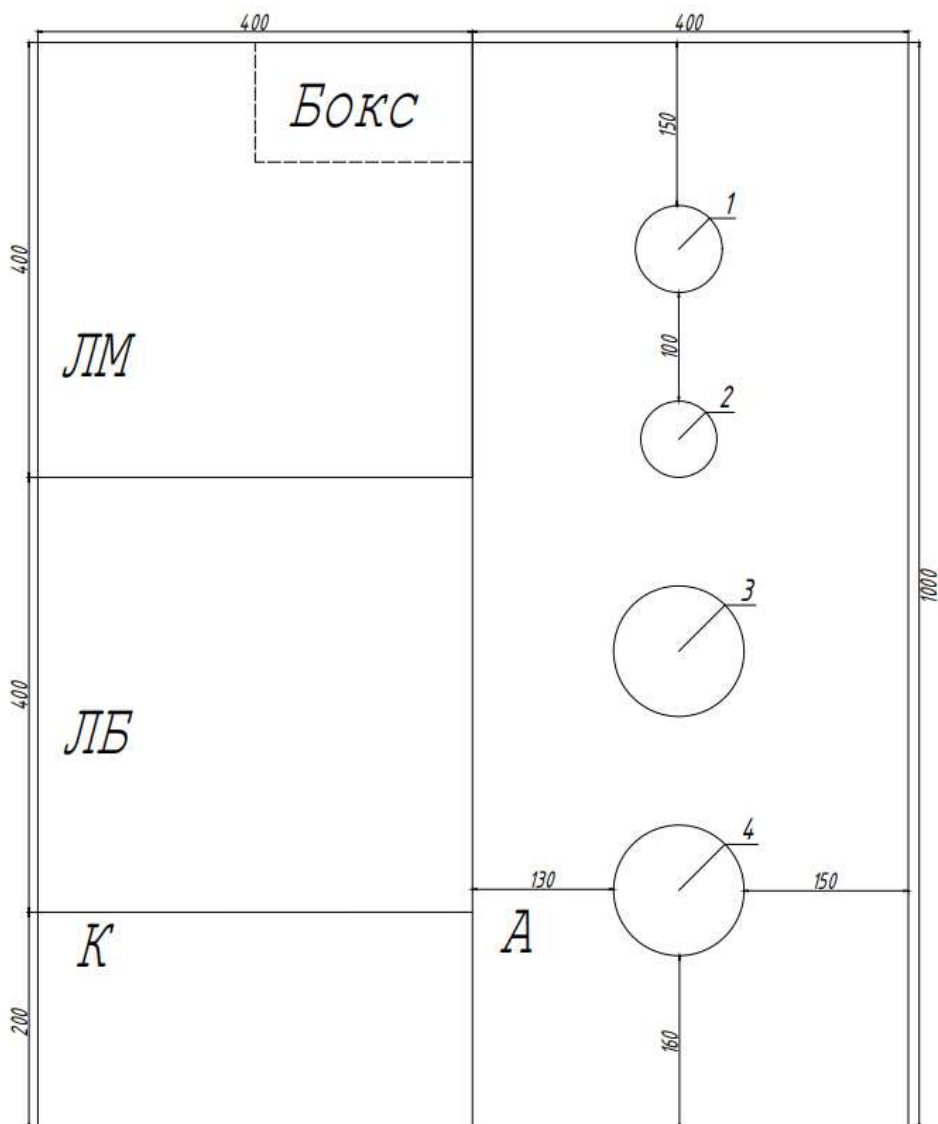


Рис. 5.1. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва ПАР А.
calcoaceticus IMB B-7241.

А – цех виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу (1 – реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 50 л; 2 – інокулятор об'ємом 50 л; 3 – реактор-змішувач для приготування середовища для біосинтезу об'ємом 500 л; 4 – ферментер об'ємом 500 л); ЛМ – мікробіологічна лабораторія; ЛБ – біохімічна лабораторія; К – приміщення з качалками.

* – розміри зазначені у см.

Виробництво ПАР здійснюється упродовж 50 днів. З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень миття підлоги здійснюють щодня, а саме 50 разів. Крім того, раз у місяць здійснюється генеральне прибирання (миття та дезінфекція стін,

підлоги, вікон тощо), тобто 2 рази на 50 днів. Для розрахунку кількості мийучих та дезінфікуючих засобів потрібно розрахувати теоретичну площу обробки мийно-дезінфікуючими засобами, при цьому враховуючи площу підлоги виробничого приміщення й площу стін на висоту 2,5 м. Оптимальна площа підлоги цеху для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу становить:

$$4 \cdot 10 = 40 \text{ м}^2$$

Площа стін:

$$((4 \cdot 2,5) + (10 \cdot 2,5)) \cdot 2 = 70 \text{ м}^2$$

Загальна площа:

$$40 + 70 = 110 \text{ м}^2$$

Загальна площа поверхні, яка піддаватиметься обробці мийно-дезінфікуючими засобами наведена у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	40	70	110
Мікробіологічна лабораторія	16	40	56
Біохімічна лабораторія	16	40	56
Качалочне приміщення	8	30	38
Загальна площа	80	180	260

Кількість виробничих циклів для синтезу ПАР становить 15. Оскільки миття та дезінфекція обладнання здійснюється перед кожним циклом, кількість таких процесів миття за повний період виробництва становить 16 (також додаткове миття після останнього циклу). Отже, загальний об'єм миття становитиме:

$$1,158 \cdot 16 = 18,528 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані по розрахунку площі миття та/або дезінфекції протягом всього періоду виробництва наведено у табл. 5.4.

**Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції оброблюваного об'єкту за
весь період виробництва ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241**

Об'єкт миття та дез- інфекції	Площа (об'єм) об- роблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкта за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	1,158	16	18,528
Підлога	80	50	4000
Стіни, двері, вікна	180	2	360

Об'єми робочих розчинів для миття та дезінфекції обладнання складають приблизно 20-30% від загального об'єму за умови встановлення СІР-мийки. Тобто за один цикл на миття та дезінфекції ферментеру, інокуляторів, ректорів-змішувачів і збірника витратиметься:

$$1,158 \cdot 0,2 = 0,232 \text{ м}^3 = 232 \text{ л}$$

Тоді за весь час виробництва ПАР буде використано наступний об'єм розчину для миття та дезінфекції:

$$0,232 \cdot 16 = 3,712 \text{ м}^3$$

За даними табл. 5.4, загальна площа миття підлоги, стін, вікон та дверей становить:

$$4000 + 360 = 4360 \text{ м}^2$$

Узагальнена характеристика витрат мийно-дезінфікуючих засобів для виробництва ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 наведені у табл. 5.5.

Підсумовуючи інформацію у табл. 5.1. та виконані розрахунки у табл. 5.5., доцільно буде обрати мийно-дезінфікуючий засіб «Стериокс» для миття і дезінфекції обладнання та «Санітаб (Sanitab)» для миття і дезінфекції стін, підлоги, вікон й дверей, оскільки порівняно з іншими засобами, представленими у вибірці, вони є найбільш ефективними мийно-дезінфікуючими засобами із широким спектром дії, низькою токсичністю для організму людини, а також мають нижчу концентрацію розчину ніж інші засоби, і як наслідок меншу вартість за 1 л робочого розчину, що є доволі економічно вигідним для виробництва.

Таблиця 5.5

Узагальнена характеристика витрат мийно-дезінфікуючих засобів для виробництва ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Назва мийно-дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Витрата на 1 м ² поверхні, л	Вартість 1 л/кг мийно-дезінфікуючого засобу, грн.*	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
«Стериокс» [1]	Обладнання	0,25	18,528 (м ³)	3712	0,1	125 (л)	0,31	1150,72
«КлінДез 401» («Clean&Dez 401») [2]		0,5	18,528 (м ³)	3712	0,1	70 (л)	0,35	1299,2
«Бактодез (Bactodez)» [3]	Стіни, підлога, вікна, двері	5	4360 (м ²)	436	0,1	93 (л)	4,65	2027,4
«Санітаб (Sanitab)» [4]		0,3	4360 (м ²)	436	0,1	185 (кг)	0,56	244,16
«Фамідез® комбі» [5]		1,0	4360 (м ²)	436	0,1	374 (л)	3,74	1630,64
«ДЕЗОлайт» [6]		4	4360 (м ²)	436	0,1	300 (л)	12	5232

Примітки. * – Ціни наведено станом на лютий 2023 р. 1 – <https://astra-life.com/ua/p495564696-sterioks-skidka-kazhdomu.html>; 2 – https://www.mpi-dpr.com.ua/na-golovnu/70-381-klindez-401-dezinfekciya-pso.html#/6-cina-5_1; 3 – <https://dom-online.com.ua/ua/p1449546876-baktodez-sredstvo-dlya.html>; 4 – <https://dental-club.com.ua/ua/p887054766-sanitab-kontejner-300.html>; 5 – <https://medmelochi.com.ua/p960891919-famidez-kombi.html>; 6 – <http://antiseptica.com.ua/dezinfekcija/instrumenty/dezolajt.html>.

5.8. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 – продуцента ПАР

Виробничий біосинтез ПАР здійснюється у ферментері об'ємом 0,5 м³, що містить 300 л поживного середовища, 6 л з яких – суспензія інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2. Отримання інокуляту проводять у три етапи: у колбах на качалці та у посівних апаратах об'ємом 5 і 50 л.

Максимальний синтез ПАР (3,6 г/л за 168 год [7]) досягається за умов росту бактеріального штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі такого складу (г/л):

- Відходи виробництва біодизелю – 5% (об'ємна частка) (63,05 г/л);
- (NH₂)₂CO – 0,35;
- NaCl – 1,0;
- Na₂HPO₄·12H₂O – 0,6;
- KH₂PO₄ – 0,14;
- MgSO₄·7H₂O – 0,1;
- дріжджовий автолізат – 0,25;
- розчин мікроелементів – 0,1% (об'ємна частка) (1 мл), що містить (г/100мл):
ZnSO₄·7H₂O – 1,1; MnSO₄·H₂O – 0,6; FeSO₄·7H₂O – 0,1; CuSO₄·5H₂O – 0,004;
CoSO₄·7H₂O – 0,03; H₃BO₃ – 0,006; KI – 0,0001; EDTA – 0,5.
- суспензія інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 – 6 л (для виробничого культивування).

Стерилізації підлягають усі компоненти поживного середовища, окрім відходів виробництва біодизелю, що є вагомою перевагою даного субстрату, оскільки, окрім гліцерину (50,4 %), вони містять велику кількість домішок (метанол, хлориди натрію або калію, етанол, зола, смоли, нелеткі органічні речовини, важкі метали, сірчанокислі сполуки), які є токсичними для більшості мікроорганізмів, пригнічуючи їх клітинний ріст [27]. Так як відходи виробництва біодизелю не потребують стерилізації, їх вносять безпосередньо перед культивуванням продуцента та після стерилізації усіх компонентів.

Під час культивування у колбах на качалці та посівних апаратах об'ємом 5 і 50 л концентрація відходів виробництва біодизелю становить 0,5% (об'ємна частка), а при виробничому культивуванні – 5% (об'ємна частка) (табл. 5.6). Нижча

концентрація субстрату у середовищі для одержання посівного матеріалу встановлена з метою скорочення тривалості лаг-фази, при виробничому біосинтезі інокулянт вирощують до середини експоненційної фази росту.

Також потрібно визначити вміст мікроелементів, необхідних для кожної стадії технологічного процесу (табл. 5.7). Доцільно приготувати запасний розчин мікроелементів об'ємом 100 мл при вирощуванні посівного матеріалу у колбах на качалці й посівних апаратах, оскільки на даних стадіях вони містяться у надзвичайно низьких концентраціях та їх кількості не можна зважити на технічних вагах. Для унеможливлення інфікування під час використання запасного розчину мікроелементів на трьох різних стадіях підготовки посівного матеріалу можна запропонувати наступний спосіб його внесення у середовище: запасний стерильний розчин мікроелементів вносити у нестерильне середовище для вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємом 5 і 50 л, у яких буде відбуватися стерилізація. На етапі виробничого біосинтезу солі мікроелементів слід об'єднати із іншими солями і стерилізувати разом (умови стерилізації стандартні для усіх солей), оскільки кількості мікроелементів можна зважити на вагах з точністю до 0,01 г.

Крім того, для культивування у колбах на качалці та посівному апараті на 5 л доцільно приготувати запасний стерильний розчин дріжджового автолізату (5%-ий розчин, тому що він є джерелом факторів росту (амінокислот, вітамінів), які необхідно вносити у поживне середовище у низьких концентраціях, так як мікроорганізм не може синтезувати їх самостійно) об'ємом 100 мл, оскільки даний розчин готується із максимально можливою концентрацією через легку контамінацію [69], та вносити необхідні кількості перед культивуванням.

Для того, щоб визначити спосіб внесення відходів виробництва біодизелю у поживне середовище, особливості приготування розчину дріжджового автолізату при культивування у посівному апараті на 50 л і виробничому ферментері, суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 на стадії виробничого культивування (табл. 5.6), необхідні для цього колби чи реактори, розрахуємо кількості таких компонентів.

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	Дріжджовий автолізат			Відходи виробництва біодизелю			Розчин мікроелементів		Суспензія інактивованих клітин <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	
	Вміст у $V_{\text{сер.}}$, г	Об'єм 5%-го розчину	Особливості приготування	Вміст, кг	Об'єм, л	Ємність для внесення	Об'єм розчину в $V_{\text{сер.}}$, мл	Особливість приготування	Об'єм, л	Особливість приготування
0,3	0,075	1,5 мл	запасний розчин у колбі на 250 мл	0,0019	0,0015	колба на 10 мл	0,3	запасний розчин	—	—
3	0,75	15 мл		0,019	0,015	колба на 50 мл	3	запасний розчин	—	—
30	7,5	150 мл	у колбі на 250 мл	0,19	0,15	колба на 250 мл	30	запасний розчин	—	—
300	75	1,5 л	у реакторі на 3 л	19	15	реактор на 25 л	—	компоненти композиції Б	6	у інокуляторі на 10 л

Примітка. * – не розраховують.

** $V_{\text{сер.}}$ – об'єм поживного середовища.

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів							
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	H_3BO_3	KI	ЕДТА
0,3	3,3 мг	1,8 мг	0,3 мг	12 мкг	0,09 мг	18 мкг	0,3 мкг	1,5 мг
3	33 мг	18 мг	3 мг	0,12 мг	0,9 мг	0,18 мг	3 мкг	15 мг
30	330 мг	180 мг	30 мг	1,2 мг	9 мг	1,8 мг	30 мкг	150 мг
300	3,3 г	1,8 г	0,3 г	0,012 г	0,09 г	0,018 г	0,0003 г	1,5 г

5.8.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у колбах на качалці

Для отримання необхідної кількості посівного матеріалу потрібно у 2 качалочних колбах об'ємом 750 мл приготувати 0,3 л поживного середовища. Оскільки його об'єм не великий, його стерилізацію будемо здійснювати в автоклаві. Проаналізувавши склад поживного середовища для культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, теоритично ділимо його на такі композиції (відповідно до режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв).

Композиція Б: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв).

Солі композиції А стерилізують за стандартною для солей температурою. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, для перешкоджання утворенню нерозчинних фосфатів магнію.

Запасний розчин мікроелементів автоклавуємо при 131°C упродовж 40 хв.

Дріжджовий автолізат є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації (режим стерилізації: 112 °C, 30 хв).

Об'єм води для композиції А є більшим, оскільки колба, яка буде стерилізуватися з даною композицією в подальшому буде використана як та, у яку будуть вноситися інші стерильні компоненти композиції.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці наведений у табл. 5.8:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 300 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
(NH ₂) ₂ CO	0,35	0,11	А	0,2
NaCl	1	0,3		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	0,03		
Вода		0,2 (л)		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,6	0,18	Б	0,1
KH ₂ PO ₄	0,14	0,04		
Вода		0,1 (л)		
Усього				0,3

5.8.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у посівному апараті об'ємом 5 л

Стерилізація 3 л поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у відповідному посівному апараті, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: (NH₂)₂CO, NaCl, MgSO₄ · 7H₂O, Na₂HPO₄ · 12H₂O, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв, рН 4,0-4,5).

Стерилізація композиції А відбувається у посівному апараті із додаванням 6%-го розчину соляної кислоти для запобігання утворення осадів фосфатів магнію. Солі розчиняють в окремому реакторі-змішувачі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація при рН 4,0-4,5, з наступним одержанням інокуляту, тому що посівний апарат обладнаний датчиком рН і не потрібно встановлювати відповідні дороговартісні датчики у реакторах. Крім того, для розчинення солей використовуємо реактор-змішувач, який працює під атмосферним тиском, що також вигідніше з економічної точки зору, так як реактори, у яких можна здійснювати стерилізацію є дорогими.

При визначенні об'єму води, що додається до композиції А, кількості компонентів солей не віднімаються, оскільки вміст солей у середовищі невеликий (не

перевищує 2,5 г/л), а отже, це не вплине на об'єм композиції. Проте об'єм води, що додається для приготування композиції А, буде зменшений, оскільки для засіву даного інокулятора потрібно внести 10% (300 мл) посівного матеріалу, а також, врахувати утворення конденсату (10%), так як стерилізація в посівному апараті проходить гострою парою.

Оскільки об'єми відходів виробництва біодизелю, запасних розчинів мікроелементів та дріжджового автолізу невеликі, на даній стадії можна опустити їх для розрахунку об'єму композицій.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 5 л наведений у табл. 1.4:

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в інокуляторі об'ємом 5 л (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
(NH ₂) ₂ CO	0,35	1,1	А	2,4
NaCl	1	3		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	0,3		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,6	1,8		
KH ₂ PO ₄	0,14	0,42		
Вода		2,4 (л)		
Конденсат		0,3 (л)		0,3
Усього				2,7

Оскільки кількість конденсату рахується від об'єму композиції, його кількість на цьому етапі має становити 0,24 л (10%), проте так як даний відсоток є приблизним, ми не можемо стверджувати, яка точна його кількість утвориться, тому округлюємо дане значення до більшого, враховуючи можливу похибку.

5.8.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у посівному апараті об'ємом 50 л

Стерилізація 30 л поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у відповідному посівному апараті, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: дріжджовий автолізат (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0-4,5).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті із додаванням 6%-го розчину соляної кислоти для запобігання утворення осадів фосфатів магнію. Солі розчиняють в окремому реакторі-змішувачі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація при рН 4,0-4,5, з наступним одержанням інокуляту, тому що посівний апарат обладнаний датчиком рН і не потрібно встановлювати відповідні дороговартісні датчики у реакторах. Крім того, для розчинення солей використовуємо реактор-змішувач, який працює під атмосферним тиском, що також вигідніше з економічної точки зору, так як реактори, у яких можна здійснювати стерилізацію є дорогими.

Стерилізацію композиції А здійснюють в автоклаві, оскільки 5%-ий розчин дріжджового автолізату потребує менш жорстких умов стерилізації ніж композиція Б, так як є термолабільним.

При визначенні об'єму води, що додається до композиції Б, кількості компонентів солей не віднімаються, оскільки вміст солей у середовищі невеликий (не перевищує 2,5 г/л), а отже, це не вплине на об'єм композиції. Також при подачі води через лічильник можлива відносна похибка дозування (2-5%) [70]. Проте об'єм води, що додається для приготування композиції Б, буде зменшений, оскільки для засіву даного інокулятора потрібно внести 10% (3 л) посівного матеріалу, а також, врахувати утворення конденсату (10%), так як стерилізація в посівному апараті проходить гострою парою, та кількість відходів виробництва біодизелю.

Оскільки об'єм запасного розчину мікроелементів невеликий, на даній стадії ним можна знехтувати при розрахунку об'єму композицій.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 50 л наведений у табл. 5.10:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в інокуляторі об'ємом 50 л ($K_3 = 0,6$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 30 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий автолізат	0,25	7,5	А	0,15
Вода		0,15 (л)		
(NH ₂) ₂ CO	0,35	10,5	Б	23,7
NaCl	1	30		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	3		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,6	18		
KH ₂ PO ₄	0,14	4,2		
Вода		23,7 (л)		
Конденсат		3 (л)		
Усього				26,9

Оскільки кількість конденсату рахується від об'єму композиції, його кількість на цьому етапі має становити 2,4 л (10%), проте так як даний відсоток є приблизним, ми не можемо стверджувати, яка точна його кількість утвориться, тому округлюємо дане значення до більшого, враховуючи можливу похибку.

5.8.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у ферментері об'ємом 0,5 м³

Для одержання посівного матеріалу на цій стадії необхідно 300 л середовища. Середовище ділять на дані композиції:

Композиція А: дріжджовий автолізат (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: (NH₂)₂CO, NaCl, MgSO₄·7H₂O, Na₂HPO₄·12H₂O, KH₂PO₄, ZnSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, FeSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, CoSO₄·7H₂O, H₃BO₃, KI, ЕДТА (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0-4,5).

Стерилізація композиції Б відбувається у ферментері із додаванням 6%-го розчину соляної кислоти для запобігання утворення осадів фосфатів магнію. Солі розчиняють в окремому реакторі-змішувачі, з якого пізніше їх подаємо в посівний апарат, де проводиться стерилізація при рН 4,0-4,5, з наступним одержанням інокуляту, тому що посівний апарат обладнаний датчиком рН і не потрібно встановлювати

відповідні дорого вартісні датчики у реакторах. Крім того, для розчинення солей використовуємо реактор-змішувач, який працює під атмосферним тиском, що також вигідніше з економічної точки зору, так як реактори, у яких можна здійснювати стерилізацію є дорогими.

Стерилізацію та приготування композиції А здійснюють в реакторі-змішувачі, оскільки 5%-ий розчин дріжджового автолізу потребує менш жорстких умов стерилізації ніж композиція Б, так як є термолабільним.

При визначенні об'єму води, що додається до композиції А і Б, кількості компонентів не віднімаються, оскільки вміст солей та дріжджового автолізу у середовищі невеликий (не перевищує 2,5 г/л), а отже, це не вплине на об'єм композиції. Також при подачі води через лічильник можлива відносна похибка дозування (2-5%) [70]. Проте об'єм води, що додається для приготування композиції Б, буде зменшений, оскільки для засіву даного ферментера потрібно внести 10% (30 л) посівного матеріалу, а також, потрібно врахувати утворення конденсату (10%), оскільки стерилізація у ферментері проходить гострою парою, та кількість відходів виробництва біодизелю. Крім того, потрібно врахувати 6 л суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2, а також, утворення конденсату (10%), оскільки стерилізація у посівному апараті для інактивації клітин проходить гострою парою.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,5 м³ наведений у табл. 5.11:

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу***A. calcoaceticus* IMB B-7241 у ферментері об'ємом 0,5 м³ (Кз = 0,6)**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 300 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий автолізат	0,25	75	А	1,5
Вода		1,5 (л)		
Конденсат		0,2 (л)		
(NH ₂) ₂ CO	0,35	105	Б	216,7
NaCl	1	300		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	30		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,6	180		
KH ₂ PO ₄	0,14	42		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,011	3,3		
MnSO ₄ · H ₂ O	0,006	1,8		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001	0,3		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,4 · 10 ⁻⁴	0,012		
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,0003	0,09		
H ₃ BO ₃	0,6 · 10 ⁻⁴	0,018		
KI	0,1 · 10 ⁻⁵	0,0003		
ЕДТА	0,005	1,5		
Вода		217 (л)		
Конденсат		30 (л)		
Суспензія інактивованих клітин <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2		6 (л)		6
Конденсат		0,6 (л)		0,6
Усього				255

Оскільки кількість конденсату рахується від об'єму композиції, його кількість на цьому етапі для композиції А має становити 0,15 л (10%), а для композиції Б – 21,7 л, проте так як даний відсоток є приблизним, ми не можемо стверджувати, яка точна його кількість утвориться, тому округлюємо дані значення до більшого, враховуючи можливу похибку.

5.9. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2

Суспензія інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 вноситься у поживне середовище на стадії безпосереднього біосинтезу поверхнево-активних речовин, у робочий ферментер 0,5 м³. Штам *B. subtilis* БТ-2 вирощують на ідентичному для продуцента

ПАР середовищі упродовж 24 год, що містить як джерело вуглецю глюкозу (5 г/л). Використання глюкози як субстрату для вирощування індуктора зумовлене тим, що він є одним з найбільш придатних для *B. subtilis* [71]. Концентрація глюкози у середовищі для культивування індуктора є невисокою, так як його вирощування здійснюється до середини експоненційної фази росту. Глюкозу вносимо у середовище у вигляді 40%-го розчину (максимально можлива концентрація), оскільки розчини вуглеводів низької концентрації легко піддаються мікробній контамінації [69].

Після 24 год вирощування індуктора культуральну рідину стерилізують у посівному апараті для одержання інактивованих клітин. Використання саме інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 як індуктора зумовлене тим, що у роботі [7] було встановлено підвищення антимікробної активності ПАР у 2-8 разів при внесенні їх у середовище культивування продуцента *A. calcoaceticus* IMB B-7241, порівняно з ПАР, утворених на середовищі без даного індуктора, водночас такий вибір є доцільнішим з технологічної точки зору.

Для одержання 6 л культуральної рідини необхідно 600 мл посівного матеріалу, так як кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Відповідно до цього підготовка посівного матеріалу індуктора буде проходити у дві стадії.

Потрібно визначити вміст мікроелементів, необхідних для кожної стадії технологічного процесу (табл. 5.12). Доцільно приготувати запасний розчин мікроелементів об'ємом 100 мл для вирощування інокуляту у колбах на качалці та посівному апараті, оскільки на даних стадіях вони містяться у надзвичайно низьких концентраціях та їх кількості не можна зважити на технічних вагах. Внесення розчину мікроелементів буде здійснюватися аналогічно як при отриманні посівного матеріалу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 для зменшення ймовірності контамінації.

Таблиця 5.12

Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів							
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	MnSO ₄ · H ₂ O	FeSO ₄ · 7H ₂ O	CuSO ₄ · 5H ₂ O	CoSO ₄ · 7H ₂ O	H ₃ BO ₃	KI	ЕДТА
0,6	6,6 мг	3,6 мг	0,6 мг	24 мкг	0,18 мг	36 мкг	0,6 мкг	3 мг
6	66 мг	36 мг	6 мг	0,24 мг	1,8 мг	0,36 мг	0,006 мг	30 мг

Враховуючи об'єми 5%-го розчину дріжджового автолізату та 40%-го розчину глюкози необхідні для приготування поживного середовища для культивування у колбах на качалках, які готуються з максимально можливою концентрацією через легку контамінацію [69], доцільно приготувати їх запасні стерильні розчини об'ємами 100 та 50 мл відповідно та вносити у поживне середовище після стерилізації інших компонентів. При отриманні посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 10 л дріжджовий автолізат та глюкозу стерилізуємо в одній композиції, оскільки ці два компоненти є термолабільними і потребують однакових режимів стерилізації.

Розрахуємо вміст та визначимося з необхідними колбами для приготування дріжджового автолізату, глюкози та розчину мікроелементів для культивування *V. subtilis* БТ-2 (табл. 5.13.).

Таблиця 5.13

**Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів
поживного середовища**

Об'єм середовища, л	Дріжджовий автолізат			Глюкоза			Розчин мікроелементів	
	Вміст у V _{сер.} , г	Об'єм 5%-го розчину	Особливості приготування	Вміст у V _{сер.} , г	Об'єм 40%-го розчину	Особливості приготування	Об'єм розчину в V _{сер.} , мл	Особливості приготування
0,6	0,15	3 мл	запасний розчин	3	7,5 мл	запасний розчин у колбі на 100 мл	0,6	запасний розчин

6	1,5	30 мл	у одній композиції із глюкозою у колбі на 200 мл	30	75 мл	у колбі на 200 мл	6	запасний розчин
---	-----	-------	--	----	-------	-------------------	---	-----------------

Примітка. * – не розраховують.

**V_{сер.} – об'єм поживного середовища.

5.9.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці

Для отримання необхідної кількості посівного матеріалу потрібно у 4 качалочних колбах об'ємом 750 мл приготувати 0,6 л поживного середовища. Оскільки його об'єм не великий, його стерилізацію будемо здійснювати в автоклаві. При вирощуванні інокуляту у колбах на качалці умовно поділимо поживне середовище на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Б: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Солі композиції А автоклавують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію.

Запасний розчин мікроелементів автоклавують при 131°С упродовж 40 хв.

Дріжджовий автолізат та глюкоза є термолабільним, тому їх запасні розчини потребують м'якого режиму стерилізації (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Об'єм води для композиції А є більшим, оскільки колба, яка буде стерилізуватися з даною композицією в подальшому буде використана як та, у яку будуть вноситися інші стерильні компоненти композиції.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці наведений у табл. 5.14.:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
(NH ₂) ₂ CO	0,35	0,21	А	0,5
NaCl	1	0,6		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	0,06		
Вода		0,3 (л)		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,6	0,36	Б	0,1
KH ₂ PO ₄	0,14	0,09		
Вода		0,3 (л)		
Усього				0,6

5.9.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту *B. subtilis* БТ-2 у посівному апараті об'ємом 10 л

Стерилізація 6 л поживного середовища, здійснюється безпосередньо у посівному апараті, що потребує перегляду композицій поживного середовища:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий автолізат (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: (NH₂)₂CO, NaCl, MgSO₄·7H₂O, NaHPO₄·12H₂O, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0-4,5).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті із додаванням 6%-го розчину соляної кислоти для запобігання утворення осадів фосфатів магнію. Солі розчиняють в окремому реакторі-змішувачі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація при рН 4,0-4,5, з наступним одержанням інокуляту та його інактивацією, тому що посівний апарат обладнаний датчиком рН і не потрібно встановлювати відповідні дороговартісні датчики у реакторах. Крім того, для розчинення солей використовуємо реактор-змішувач, який працює під атмосферним тиском, що також вигідніше з економічної точки зору, так як реактори, у яких можна здійснювати стерилізацію є дорогими.

Глюкоза та дріжджовий автолізат вносяться у середовище у вигляді 40 % і 5% -ого розчину відповідно, тобто у вигляді розчинів з максимальною концентрацією через легку контамінацію [69]. Оскільки об'єми 40%-го розчину глюкози та 5%-го

розчину дріжджового автолізу , необхідні для даної стадії, є невеликими, стерилізацію композиції А здійснюють в автоклаві. Крім того, глюкоза і дріжджовий автолізат є термолабільними речовинами, тому їх стерилізують при 112 °С упродовж 30 хв.

Після 24 год вирощування індуктора культуральну рідину стерилізують гострою парою при 131 °С протягом 1 год для одержання інактивованих клітин, які вносять у виробничий ферментер об'ємом 0,5 м³ для синтезу поверхнево-активних речовин.

При визначенні об'єму води, що додається до композиції Б, кількості компонентів солей не віднімаються, оскільки вміст солей у середовищі невеликий (не перевищує 2,5 г/л), а отже, це не вплине на об'єм композиції. Також при подачі води через лічильник можлива відносна похибка дозування (2-5%) [70]. Проте об'єм води, що додається для приготування композиції Б, буде зменшений, оскільки для засіву даного інокулятора потрібно внести 10% (0,6 л) посівного матеріалу, а також, врахувати утворення конденсату (10%), так як стерилізація в посівному апараті проходить гострою парою. Оскільки об'єм запасного розчину мікроелементів невеликий, на даній стадії ним можна знехтувати для розрахунку об'єму композицій.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л наведений у табл. 5.15.:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2 в інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	5	30	А	0,1
Дріжджовий автолізат	0,25	1,5		
Вода		0,05 (л)		
(NH ₂) ₂ CO	0,35	2,1	Б	4,7
NaCl	1	6		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	0,6		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,6	3,6		
KH ₂ PO ₄	0,14	0,84		
Вода		4,7 (л)		
Конденсат		0,6 (л)		0,6
Усього				5,4

Оскільки кількість конденсату рахується від об'єму композиції, його кількість на цьому етапі має становити 0,47 л (10%), проте так як даний відсоток є приблизним, ми не знаємо, яка точна його кількість утвориться, тому округлюємо дане значення до більшого, враховуючи можливу похибку.

5.10. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Зважаючи на те, що при підготовці поживних середовищ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у посівних апаратах об'ємом 5 та 50 л і ферментері (0,5 м³) та *B. subtilis* БТ-2 у посівному апараті (10 л) передбачається стерилізація розчину всіх солей (як фосфорних, так і солей магнію) безпосередньо у апаратах, а також можлива зміна рН у процесі культивування продуцента ПАР та індуктора, необхідно здійснити вибір титрувальних агентів для цих стадій.

Крім того, за потреби, відповідно до складу поживного середовища, здійснити вибір та приготування піногасників.

5.10.1. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для підготовки поживних середовищ продуцента ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2

Для регуляції рН перед стерилізацією поживних середовищ для одержання посівного матеріалу *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в апаратах об'ємом 5 л, 50 л та

ферментері 0,5 м³, а також індуктора *B. subtilis* БТ-2 в апараті об'ємом 10 л необхідно використовувати 6%-ий розчин HCl. Так для підкислення композицій поживних середовищ, які містять одночасно фосфорні солі і солі Магнію, для унеможливлення утворення нерозчинних солей під час стерилізації, рН розчину доводять до 4,0 – 4,5 додаванням 6%-го розчину хлоридної кислоти (табл. 5.16), що у свою чергу дозволяє спростити технологічний процес. Розчин соляної кислоти вноситься у нестерильне поживне середовище, тому не потребує стерилізації [57].

Враховуючи невеликий об'єм внесення 6%-го розчину соляної кислоти необхідний на другій стадії підготовки поживного середовища для продуцента й індуктора, доцільно приготувати більші об'єми даного розчину для зручності процесу приготування (табл. 5.16).

Таблиця 5.16

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних агентів для стерилізації поживних середовищ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *B. subtilis* БТ-2

Назва мікроорганізму	Об'єм середовища, л	HCl (6%)	
		Об'єм, мл	Особливість приготування
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	0,3	–	–
	3	6 (25 мл при приготуванні розчину)	у колбі на 50 мл
	30	60	у колбі на 100 мл
	300	600	у колбі на 1 л
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,6	–	–
	6	12 (25 мл при приготуванні розчину)	у колбі на 50 мл

Примітка. * – не розраховують.

Для регуляції рН перед початком культивування використовуємо 6%-ий розчин NaOH. Оскільки перед стерилізацією поживних середовищ здійснювали їх підкислення до рН 4,0-4,5, а процес ферментації повинен проходити за нейтрального значення рН (6,8-7,0) [7], яке є оптимальним для культури продуцента (так як *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є нейтрофілом [28]) та індуктора, то перед внесенням

посівного матеріалу поживне середовище підлучають стерильним 6%-им розчином їдкого натру, який автоклавують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв [57].

Враховуючи невеликий об'єм внесення 6%-го розчину їдкого натру необхідний на другій стадії підготовки поживного середовища для продуцента й індуктора, доцільно приготувати більші об'єми даного розчину для зручності процесу приготування та стерилізації (табл. 5.17).

Таблиця 5.17

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних агентів при культивуванні *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *B. subtilis* БТ-2

Назва мікроорганізму	Об'єм середовища, л	NaOH (6%)	
		Об'єм, мл	Особливість приготування
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	0,3	—	—
	3	6 (25 мл при стерилізації розчину)	у колбі на 50 мл
	30	60	у колбі на 150 мл
	300	600	у колбі на 1,5 л
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,6	—	—
	6	12 (25 мл при стерилізації розчину)	у колбі на 50 мл

Примітка. * – не розраховують.

5.10.2. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для культивування продуцента ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2

У поживному середовищі вищезазначеного складу (див. пункт 5.2) присутній органічний азот (сечовина), який транспортується у клітини мікроорганізмів симпортом з протоном, що призводить до підлучення культуральної рідини, а також відходи виробництва біодизелю, які характеризуються високою лужністю [72], проте під час культивування продуцента ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 рН середовища не змінюється, залишаючись стабільно близьким до 6,8-7,0 (експериментальні дані). Ми припускаємо, що підтриманню рН на оптимально нейтральному рівні сприяють відмінні від ПАР екзометаболіти кислої природи, які синтезуються у процесі культивування, підкислюючи поживне середовище, тим самим нейтралізуючи лужність

сечовини та відходів виробництва біодизелю, тому приготування титрувальних розчинів під час даного процесу є не потрібним.

У складі поживного середовища для культивування індуктора *B. subtilis* БТ-2 теж присутня сечовина (див. пункт 5.3), яка призводить до підлужнення культуральної рідини, проте під час культивування рН середовища залишається стабільно нейтральним (експериментальні дані), що можна пояснити здатністю виду *B. subtilis* до синтезу кислот [73], частка яких ймовірно утворюється у процесі отримання посівного матеріалу, підкислюючи поживне середовище, тим самим нейтралізуючи лужність сечовини, що також виключає потребу у приготування титрувальних розчинів під час даного процесу.

5.10.3. Обґрунтування вибору піногасників при культивуванні продуцента ПАР

***A. calcoaceticus* IMB B-7241 та біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2**

При використанні як субстрату відходів виробництва біодизелю оснащення ферментера додатковим піногасником не є необхідним. Оскільки відходи містять у своєму складі такі компоненти як жирні кислоти, олеати, тригліцериди [27], тому піна під час процесу ферментації утворюватися не буде.

При використанні як субстрату глюкози піна теж утворюватися не буде, тому оснащення посівного апарата для вирощування індуктора додатковим піногасником виключається.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі допоміжні роботи:

- підготовка стерильного аераційного повітря;
- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його у посівному апараті об'ємом 5, 50 л та ферментері об'ємом 0,5 м³;
- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування у посівному апараті об'ємом 5, 50 л та ферментері об'ємом 0,5 м³;
- приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці та посівних апаратах на 5 та 50 л;

- приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці та посівному апараті на 5 л;
- приготування та стерилізація середовища для вирощування біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці, посівному апараті на 10 л;
- стерилізація культуральної рідини *B. subtilis* БТ-2 у посівному апараті на 10 л, для отримання суспензії інактивованих клітин.

Допоміжні роботи при вирощуванні біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2:

- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його у посівному апараті об'ємом 10 л;
- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації pH середовища перед початком культивування у посівному апараті об'ємом 10 л;
- приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці та посівному апараті на 10 л;
- приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці;
- приготування і стерилізація запасного розчину глюкози для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці.

Окрім основних реакторів для розчинення композицій солей, також необхідно передбачити такі реактори:

- У цеху підготовки посівного матеріалу:
 - реактор-змішувач для приготування композиції Б: 5 л; 50 л;
 - реактор-змішувач для приготування композиції Б поживного середовища для отримання суспензії клітин *B. subtilis* БТ-2: 10 л.
- У цеху виробничого біосинтезу:
 - реактор-змішувач для приготування та стерилізації дріжджового автолізу (3 л);
 - реактор-змішувач для приготування композиції Б: 0,5 м³;
 - реактор-змішувач для відходів виробництва біодизелю (25 л).

РОЗДІЛ 6

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

6.1. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітродувка FPZ серії 40 DH MD. Виробник: «FPZ», Італія. Надлишковий тиск: 0,5 бар. Продуктивність: 140 м³/год. Потужність двигуна: 3,0 кВт. Габаритні розміри, мм: 440x350x372 [74, 75].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр OMEGA AIR AAF 0706. Виробник: «OMEGA AIR», Італія. Фільтруючий матеріал: акрилове волокно. Мінімальний розмір уловлювання частинок: 3 мкм. Габаритні розміри, мм: 641x125x37x530. Максимальна робоча температура: до 65 °С. Максимальний робочий тиск: 16 бар. Продуктивність: 780 Нм³/год (48,75 м³/год). E=95% [58].
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор Т2. Виробник: «Dalgakiran», Україна. Продуктивність: 1394-2250 м³/год (23-37 м³/хв). Робочий тиск: 5.5 – 8.8 бар. Габаритні розміри, мм: 2450x1640x1900 [76].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий осушувач повітря Hankison рефрижераторного типу. Виробник: «Dalgakiran», Україна. Продуктивність: 20-1700 м³/год. Потужність: 0,24-5,7 кВт. Габарити, мм: 390x344x320. [77].

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА				Літ.	Арк.	Акрушів		
Розробив	Благодир Д. О.											83	18
Консульт.													
Керівник	Пирог Т. П.												
Н. Контр.													
Зав. каф.	Стабніков В. П.				Кафедра БТМ								

1	2	3	4
P-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний РВ 2000. Виробник: «Центррезервуарсервіс», Україна Об'єм: 900 л. Номінальний тиск: 3 МПа. Габаритні розміри, мм: 812x1885 [78].
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000x500-2. Виробник: «Вентс», Україна. Нагрівач: водяний. Мінімальний робочий тиск 16 бар. Максимальна температура води: 100 °С. Габаритні розміри, мм: 1165x540x200. [79]
Ф-7	Головний фільтр очищення повітря	1	Фільтр OMEGA AIR AAF 0706. Виробник: «OMEGA AIR», Італія. Фільтруючий матеріал: акрилове волокно. Мінімальний розмір уловлювання частинок: 1 мкм. Габаритні розміри, мм: 641x125x37x530. Максимальна робоча температура: до 65 °С. Максимальний робочий тиск: 16 бар. Продуктивність: 780 Нм³/год (48,75 м³/год). Е=98% [58].
ІФ-8	Індивідуальний фільтр очищення повітря для І-11	1	Фільтр OMEGA AIR AAF 0006. Виробник: «OMEGA AIR», Італія. Фільтруючий матеріал: борово-силікатне мікрОВОлокно. Мінімальний розмір уловлювання частинок: 0,1 мкм. Габаритні розміри, мм: 105x55x14x50. Максимальна робоча температура: до 65 °С. Максимальний робочий тиск: 16 бар. Продуктивність: 10 Нм³/год (0,63 м³/год). Е=99,999% [58].
P-9	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор LRG-1 об'ємом 5 л. Виробник: «Machine», Україна. Матеріал контактних частин: нержавіюча сталь AISI 316 L. Оснащений сорочкою, якірною мішалкою: 25-55 об/хв. Потужність приводу: 0,15 кВт. Габаритні розміри, мм: 400x660x940 [80].
H-10	Насос мембранний для перекачування композиції А до І-11	1	Насос мембранний SEKO SPRING MS1A064C21A4000. Виробник: «Seko», Італія. Потужність: 0,18 кВт. Тиск: 16 бар. Матеріал: нержавіюча сталь 316. Продуктивність: 11 л/год (0,18 л/хв) [81].
I-11	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-5SJ об'ємом 5 л. Виробник: «Innova Bio-Meditech», Китай. Матеріал контактних частин: нержавіюча сталь 316L. Оснащений барботером, датчиком рН, сорочкою, рО2, температури, пробовідбірником, манометром, механічною мішалкою: 70-1000 об/хв. Потужність приводу: 2 кВт. Габаритні розміри, мм: 890x660x1600 [82].

1	2	3	4
Д-12 Д-18 Д-22	Лічильник для подачі питної води для Р-14, Р-20 та Р-24	3	Дозатор рідини та води. Країна виробник: Китай. Об'єм дозуючої води: 0,1-999,9 л. Тиск: 0-1,5 МПа. Відносна похибка дозування: 2-5%. Витрати води: 0-10 л/хв [70].
ІФ-13	Індивідуальний фільтр очистки повітря для І-16	1	Фільтр OMEGA AIR AAF 0056. Виробник: «OMEGA AIR», Італія. Фільтруючий матеріал: боросилікатне мікрОВОлокно. Мінімальний розмір уловлювання частинок: 0,1 мкм. Габаритні розміри, мм: 189x88x21x60. Максимальна робоча температура: до 65°C. Максимальний робочий тиск: 16 бар. Продуктивність: 60 Нм³/год (3,75 м³/год). Е=99,999% [58].
Р-14	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор KEDA об'ємом 50 л. Виробник: «LaiZhou KeDa Chemical Machinery», Китай. Матеріал контактних частин: нержавіюча сталь SS304 та 316L. Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 63 об/хв. Потужність приводу: 1,1 кВт. Габаритні розміри, мм: 800x800x1600 [83].
Н-15	Насос мембранний для перекачування композиції Б до І-16	1	Насос мембранний SEKO SPRING MS1B108C21A4000. Виробник: «Seko», Італія. Потужність: 0,18 кВт. Тиск: 16 бар. Матеріал: нержавіюча сталь 316. Продуктивність: 120 л/год (2 л/хв) [81].
І-16	Інокулятор	1	Інокулятор LB-16SFM об'ємом 50 л. Виробник: «Labotronics», Велика Британія. Матеріал контактних частин: нержавіюча сталь 316L. Оснащений барботером, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури, пробовідбірником, манометром, механічною мішалкою: 70-800 об/хв. Внутрішній тиск: 0,3 МПа. Потужність приводу: 3 кВт. Габаритні розміри, мм: 1200x700x1700 [84].
Д-17	Ваговий дозатор для подачі деяких компонентів композиції А до Р-20	1	Ваговий дозатор F-500 для реактора-змішувача об'ємом 500 л. Виробник «DongYang», Китай. Швидкість дозування 5-15 разів/хв. Вага доз: 2-500 г. Точність зважування: ± 0,3 г. Потужність: 0,2 кВт. Габаритні розміри, см: 600x320x570 [85].
ІФ-19	Індивідуальний фільтр очистки повітря для ФР-29	1	Фільтр OMEGA AIR AAF 0706. Виробник: «OMEGA AIR», Італія. Фільтруючий матеріал: акрилове волокно. Мінімальний розмір уловлювання частинок: 0,1 мкм. Габаритні розміри, мм: 641x125x37x530. Максимальна робоча температура: до 65 °С. Максимальний робочий тиск: 16 бар. Продуктивність: 780 Нм³/год (48,75 м³/год). Е=99,999% [58].

1	2	3	4
P-20	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор KEDA об'ємом 500 л. Виробник: «LaiZhou KeDa Chemical Machinery», Китай. Матеріал контактних частин: нержавіюча сталь SS304 та 316L. Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 63 об/хв. Потужність приводу: 4 кВт. Габаритні розміри, мм: 1200x1200x2000 [83].
H-21 H-30	Насос мембранний для перекачування композиції Б до ФР-29 та для перекачування культуральної рідини у збірник від ФР-29	2	Насос мембранний SEKO SPRING MS1C165Q21W200A. Виробник: «Seko», Італія. Потужність: 0,55 кВт. Тиск: 2 бар. Матеріал: нержавіюча сталь 316. Продуктивність: 1200 л/год (20 л/хв) [81].
ІФ-23	Індивідуальний фільтр очистки повітря для І-26	1	Фільтр OMEGA AIR AAF 0006. Виробник: «OMEGA AIR», Італія. Фільтруючий матеріал: боросилікатне мікрроволокно. Мінімальний розмір уловлювання частинок: 0,1 мкм. Габаритні розміри, мм: 125x55x14x70. Максимальна робоча температура: до 65 °С. Максимальний робочий тиск: 16 бар. Продуктивність: 18 Нм³/год (1,13 м³/год). Е=99,999% [58].
P-24	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор СЕон 0,010 об'ємом 10 л. Виробник: «ЄвроХімМаш», Україна. Матеріал контактних частин: емальована сталь. Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв. Потужність приводу: 0,75 кВт. Габаритні розміри, мм: 420x350x500 [86].
H-25	Насос мембранний для перекачування композиції Б до І-26	1	Насос мембранний SEKO SPRING MS1A094B21A4000. Виробник: «Seko», Італія. Потужність: 0,18 кВт. Тиск: 16 бар. Матеріал: нержавіюча сталь 316. Продуктивність: 26 л/год (0,4 л/хв) [81].
І-26	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-10SJ об'ємом 10 л. Виробник: «Innova Bio-Meditech», Китай. Матеріал контактних частин: нержавіюча сталь 316L. Оснащений барботером, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури, пробовідбірником, манометром, механічною мішалкою: 70-1200 об/хв. Потужність приводу: 2 кВт. Габаритні розміри, мм: 890x660x1600 [82].
P-27	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор REAC-3L об'ємом 3 л. Виробник: «MUNRO», Великобританія. Матеріал контактних частин: боросилікатне скло. Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 40-500 об/хв. Потужність приводу: 50 Вт. Вакуум: -0,095 МПа. Габаритні розміри, мм: 480x420x1200 [87].

1	2	3	4
P-28	Реактор-змішувач для відходів виробництва біодизелю	1	Реактор СЕон 0,025 об'ємом 25 л. Виробник: «Євро-ХімМаш», Україна. Матеріал контактних частин: емальована сталь. Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв. Потужність приводу: 0,75 кВт. Габаритні розміри, мм: 520x450x650 [86].
ФР-29	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 500 л. Виробник: «Ruian Global Machinery», Китай. Матеріал контактних частин: нержавіюча сталь 316L. Оснащений барботером, подвійною сорочкою, рО ₂ , датчиком рН, температури, пробовідбірником, турбінною мішалкою: 300 об/хв, манометром. Потужність приводу: 1,2 кВт. Внутрішній тиск: 0,2 МПа. Габаритні розміри, мм: 700x2600 [56].

6.2. Обґрунтування продуктивності обраних фільтрів для підготовки аераційного повітря

При виборі фільтрів для підготовки аераційного повітря необхідно орієнтуватися на їх продуктивність для забезпечення достатньої аерації культуральної рідини. Так для подальшого пошуку фільтрів за заданим параметром варто розрахувати потрібну кількість повітря для аерації залежно від об'ємів культуральної рідини.

Зазвичай кількість аераційного повітря, що подається у ферментер (інокулятори) варіюється від 1,0 до 2,0 об'ємів повітря на 1 об'єм поживного середовища за хвилину ($\text{м}^3 \text{ повітря} / \text{м}^3 \text{ ПС} \cdot \text{хв.}$) [57]. З даного діапазону оберемо співвідношення об'єму повітря до об'єму поживного середовища як 2:1 відповідно.

Оскільки у системі підготовки аераційного повітря присутні фільтри, через які проходить очистка усього приливної повітря (фільтр грубої та головний фільтр очистки повітря), для вибору цих фільтрів із потрібною продуктивністю необхідно орієнтуватися на найбільший об'єм культуральної рідини, який буде аеруватися, а саме у виробничому ферментері ФР-29, так як для цього об'єму витрати аераційного повітря будуть найбільшими.

Об'єм культуральної рідини при виробничому біосинтезі складає 300 л, тому:

$$300 \text{ л} \cdot 2 = 600 \text{ л повітря/хв}$$

$$600 \text{ л} \cdot 60 = 36\,000 \text{ л повітря/год або } 36 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Отже, фільтр грубої та головний фільтр очистки повітря повинні мати продуктивності по 36 м^3 повітря/год.

Враховуючи, що кожен виробник виготовляє фільтри із стандартною продуктивністю, що ускладнює їх пошук відповідно до отриманих розрахунків, обираємо фільтри, продуктивність яких є наближеною до розрахованого значення, а саме – 780 Нм^3 повітря/год [58] (при нормальних умовах: тиску $101\,325 \text{ Па}$ та температурі 0°C). Розрахуємо продуктивність при тиску 16 бар :

$$780 \text{ Нм}^3 : 16 \text{ бар} = 48,75 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Повітря, очищене у головному фільтрі, подається на індивідуальні фільтри, які встановлені безпосередньо перед ферментером (інокуляторами), які мають різні об'єми культуральної рідини, що вимагає здійснення вибору фільтрів із різною продуктивністю.

➤ Розрахунок продуктивності індивідуального фільтру ІФ-8 очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 3 л , у інокуляторі І-12, об'ємом 5 л :

$$3 \text{ л} \cdot 2 = 6 \text{ л повітря/хв}$$

$$6 \text{ л} \cdot 60 = 360 \text{ л повітря/год або } 0,36 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Отже, індивідуальний фільтр очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 3 л , повинен мати продуктивність $0,36 \text{ м}^3$ повітря/год. Обираємо фільтр, продуктивність якого є наближеною до розрахованого значення, а саме – 10 Нм^3 повітря/год [58] (при нормальних умовах: тиску $101\,325 \text{ Па}$ та температурі 0°C). Розрахуємо продуктивність при тиску 16 бар :

$$10 \text{ Нм}^3 : 16 \text{ бар} = 0,63 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

➤ Розрахунок продуктивності індивідуального фільтру ІФ-13 очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 30 л , у інокуляторі І-16, об'ємом 50 л :

$$30 \text{ л} \cdot 2 = 60 \text{ л повітря/хв}$$

$$60 \text{ л} \cdot 60 = 3600 \text{ л повітря/год або } 3,6 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Отже, індивідуальний фільтр очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 30 л , повинен мати продуктивність $3,6 \text{ м}^3$ повітря/год.

Обираємо фільтр, продуктивність якого є наближеною до розрахованого значення, а саме – 60 Нм³ повітря/год [58] (при нормальних умовах: тиску 101 325 Па та температурі 0°C). Розрахуємо продуктивність при тиску 16 бар:

$$60 \text{ Нм}^3 : 16 \text{ бар} = 3,75 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

➤ Розрахунок продуктивності індивідуального фільтру ІФ-19 очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 300 л, у ферментері ФР-29, об'ємом 500 л:

$$300 \text{ л} \cdot 2 = 600 \text{ л повітря/хв}$$

$$600 \text{ л} \cdot 60 = 36\,000 \text{ л повітря/год або } 36 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Отже, індивідуальний фільтр очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 30 л, повинен мати продуктивність 36 м³ повітря/год.

Обираємо фільтр, продуктивність якого є наближеною до розрахованого значення, а саме – 780 Нм³ повітря/год [58] (при нормальних умовах: тиску 101 325 Па та температурі 0°C). Розрахуємо продуктивність при тиску 16 бар:

$$780 \text{ Нм}^3 : 16 \text{ бар} = 48,75 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

➤ Розрахунок продуктивності індивідуального фільтру ІФ-23 очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 6 л, у інокуляторі І-26, об'ємом 10 л:

$$6 \text{ л} \cdot 2 = 12 \text{ л повітря/хв}$$

$$12 \text{ л} \cdot 60 = 720 \text{ л повітря/год або } 0,72 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Отже, індивідуальний фільтр очищення повітря для аерації культуральної рідини, об'ємом 6 л, повинен мати продуктивність 0,72 м³ повітря/год.

Обираємо фільтр, продуктивність якого є наближеною до розрахованого значення, а саме – 18 Нм³ повітря/год [58] (при нормальних умовах: тиску 101 325 Па та температурі 0°C). Розрахуємо продуктивність при тиску 16 бар:

$$18 \text{ Нм}^3 : 16 \text{ бар} = 1,13 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Розрахунок необхідних кількостей повітря для аерації відповідних об'ємів культуральної рідини та продуктивність фільтрів для його підготовки наведені у табл. 6.2:

Підбір фільтрів для підготовки аераційного повітря

Найменування фільтру	Виконувана задача	Характеристика
Фільтр грубої очистки повітря Ф-2	Попереднє очищення всього повітря, що надходить з повітродувки. $E=95\%$	Продуктивність: 48,75 м ³ /год.
Головний фільтр очистки повітря Ф-7	Очищення всього повітря, що поступає із компресора. $E=98\%$.	Продуктивність: 48,75 м ³ /год.
Індивідуальний фільтр ІФ-8	Очищення повітря, що надходить до І-11, об'ємом 5 л. $E=99,999\%$ Кількість повітря для аерації середовища складає 360 л/год (0,36 м ³ /год).	Продуктивність: 0,63 м ³ /год.
Індивідуальний фільтр ІФ-13	Очищення повітря, що надходить до І-16, об'ємом 50 л. $E=99,999\%$ Кількість повітря для аерації середовища складає 3600 л/год (3,6 м ³ /год).	Продуктивність: 3,75 м ³ /год.
Індивідуальний фільтр ІФ-19	Очищення повітря, що надходить до ФР-29, об'ємом 500 л. $E=99,999\%$ Кількість повітря для аерації середовища складає 36000 л/год (36 м ³ /год).	Продуктивність: 48,75 м ³ /год.
Індивідуальний фільтр ІФ-23	Очищення повітря, що надходить до І-26, об'ємом 10 л. $E=99,999\%$ Кількість повітря для аерації середовища складає 720 л/год (0,72 м ³ /год).	Продуктивність: 1,13 м ³ /год.

6.3. Обґрунтування продуктивності обраних лічильників, вагового дозатору та насосів

Головним критерієм при виборі лічильників та насосів із необхідною продуктивністю є врахування часу, за який рідина буде подана до апаратів. Зазвичай, лічильники для води підбираються так, щоб наповнювання ємності тривало упродовж не менше як 10-15 хв та не більше 30 хв. Аналогічно підбирають і насоси, щоб час перекачування певного об'єму рідини тривав 10-30 хв [57] (табл. 6.3).

За інформацією продавця [70] продуктивність лічильника для води становить у діапазоні від 0 до 10 л/хв, за рахунок чого забезпечується подача води з різною швидкістю, що дозволяє встановити однакові лічильники на реакторах Р-14, Р-20 та Р-24 (табл. 6.3).

Щодо вагових дозаторів, то основною характеристикою при їх виборі є вага дози, яку необхідно подати. Так для виробничого біосинтезу маса деяких компонентів перевищує 100 г ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 105 г, NaCl – 300 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 180 г), тому для зручності їх дозування та подачі у реактор-змішувач Р-20 обираємо ваговий дозатор із вагою доз у діапазоні 2-500 г [85] (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Підбір лічильників, вагового дозатору та насосів

Найменування обладнання	Виконувана задача	Характеристика
Лічильник Д-12	Подача питної води до реактора Р-14, об'ємом 23,7 л.	Витрати води: 2 л/хв. Час наповнення ємності: 12 хв.
Лічильник Д-22	Подача питної води до реактора Р-24, об'ємом 4,7 л.	Витрати води: 0,4 л/хв. Час наповнення ємності: 12 хв.
Дозатор Д-17	Зважування компонентів середовища для реактора Р-20, об'ємом 500 л	Вага доз: 2-500 г. Швидкість дозування 5-15 разів/хв.
Лічильник Д-18	Подача питної води до реактора Р-20, об'ємом 216,7 л	Витрати води: 10 л/хв. Час наповнення ємності: 22 хв.
Насос мембранний Н-10	Перекачування композиції А із реактора Р-9, об'ємом 5 л, до інокулятора І-11, об'ємом 5 л	Продуктивність: 11 л/год (0,18 л/хв). Час перекачування: 17 хв.

Насос мембранний Н-15	Перекачування композиції Б із реактора Р-14, об'ємом 50 л, до інокулятора І-16, об'ємом 50 л	Продуктивність: 120 л/год (2 л/хв). Час перекачування: 15 хв.
Насос мембранний Н-21	Перекачування композиції Б із реактора Р-20, об'ємом 500 л, до ферментера ФР-29, об'ємом 500 л	Продуктивність: 1200 л/год (20 л/хв). Час перекачування: 15 хв.
Насос мембранний Н-30	Перекачування культуральної рідини із ферментера ФР-29, об'ємом 500 л, до збірника	Продуктивність: 1200 л/год (20 л/хв). Час перекачування: 15 хв.
Насос мембранний Н-25	Перекачування композиції Б із реактора Р-24, об'ємом 10 л, до інокулятора І-26, об'ємом 10 л	Продуктивність: 26 л/год (0,4 л/хв) Час перекачування: 15 хв.

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічний процес біосинтезу комплексу поверхнево-активних речовин (ПАР) на основі бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 складається із допоміжних та основних робіт. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища, приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів, приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: приготування посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

Крім того, технологічна схема передбачає приготування біологічного індуктора – суспензії інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ-2, яка також, складається із допоміжних робіт (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища, приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів, приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу, приготування і стерилізація запасного розчину глюкози) та основних (приготування посівного матеріалу).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Включає навчання персоналу для подальшого кваліфікованого виконання обов'язків, проходження інструктажу із техніки безпеки та санітарно-гігієнічну підготовку (правила особистої гігієни, миття рук).

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину «Стериоксу»

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Благодир Д. О.				ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							93	17
Керівник	Пирог Т. П.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В. П.							

Відповідно до даних розділу 5, необхідно приготувати 232 л робочого мийно-дезінфікуючого розчину «Стериоксу» концентрацією 0,25 % для миття та дезінфекції обладнання за один цикл виробництва. Для цього у ємність об'ємом 250 л вносять 0,58 л концентрованого розчину «Стериоксу», додають 174 л питної води та перемішують.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину «Санітабу»

Кількість робочого розчину «Санітабу» концентрацією 0,3% для виконання прибирання становить 8,4 л. Для його приготування у ємність об'ємом 10 л вносять 0,025 л концентрованого розчину «Стериоксу», додають 5,9 л питної води та перемішують.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання.

Проведення щоденного прибирання здійснюється за допомогою мийно-дезінфікуючого засобу «Санітабу» (від ДР 1.2.2.) концентрацією 0,3%. Комплекс дій щоденного прибирання включає миття та дезінфекцію підлоги, поверхонь обладнання і приміщення. Зміну ємності з мийно-дезінфікуючим засобом виконують кожні 30 м². Відпрацьовані розчини подають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 12.1). Відповідно до мікробіологічного контролю: КУО < 800/см².

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Для проведення генерального прибирання виробничих приміщень використовують 0,3 % розчин «Санітабу» (від ДР 1.2.2.). Процес генерального прибирання проводиться на виробництві з періодичністю один раз на місяць, який включає миття та дезінфекцію стін, вікон, підлоги, дверей, а також поверхонь обладнання і приміщення. Відпрацьовані розчини подають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 12.1). Відповідно до мікробіологічного контролю: КУО < 300/см².

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття, дезінфекція та ополіскування обладнання

Для миття та дезінфекції обладнання та комунікацій використовують розчин «Стериоксу» у концентрації 0,25 % (від ДР. 1.2.1) підігрітого до температури 70 – 80 °С. Розчином «Стериоксу» промивають обладнання протягом 1 год за допомогою СІР-мийки. Відпрацьований мийно-дезінфікуючий розчин йде на стадію

знешкодження відходів (до *ЗВ 12.1*). Ополіскування здійснюють технічною водою кімнатної температури. Після зливу вода направляється на стадію знешкодження відходів (до *ЗВ 12.1*).

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Після миття, дезінфекції та ополіскування обладнання здійснюють його огляд з метою виявлення нещільностей у комунікаціях чи запірній арматурі. При виявленні неущільнених ділянок, здійснюють відповідно роботи для їх усунення (підтягування різьби).

ДР 1.4.3. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірка обладнання на герметичність здійснюється шляхом створення в ньому надлишкового тиску (0,1-0,2 МПа) та витримці протягом 30-60 хв. Для цього необхідно закрити усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подати аераційне повітря до рівня надлишкового тиску. Після чого перекрити вентиль подачі повітря і зафіксувати показання манометра на кришці апарату та час витримки у операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа. Відпрацьоване повітря йде на стадію знешкодження відходів (до *ЗВ 12.2*). Якщо апарат не відповідає встановленим межам виконують пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів (чотирихлористий карбон – CCl_4). Дана операція здійснюється за температури 80 °С, збільшуючи тиск до 0,2 МПа, протягом 1,5-2 год.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Стерилізацію обладнання та комунікацій здійснюють подачею гострої пари під тиском безпосередньо в апарат. При досягненні в апаратах температури стерилізації 130-135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,2 МПа). Після закінчення стерилізації для забезпечення та підтримки асептики до обладнання через барботер подають стерильне повітря, підтримуючи тиск на рівні 0,02-0,03 МПа. Охолодження здійснюють до температури 30-40°С та надлишкового тиску 0,003-0,005 МПа протягом 0,5 год. При стерилізації апарата паралельно виконується стерилізація індивідуальних фільтрів стерильного та відпрацьованого повітря.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітродувки (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 10 м (висота поверху – 6 м, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де встановлюють обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 2.2. Очистка повітря від грубих часток

Попереднє очищення повітря (від ДР 2.1) проводять у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення до 95%, затримуючи при цьому частинки розміром більше 5 мкм.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря (від ДР 2.2) здійснюють у турбокомпресорі (К-3), щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний опір під час диспергування повітря у об'ємі культуральної рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35-0,5 МПа, температура – до 120-250°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря після виходу з компресора (від ДР 2.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°C. Далі зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де проходить вирівнювання тиску та стабілізації потоку повітря. На даному етапі показник вологості зменшується до 60%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря (від ДР 2.4) передається до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°C. На цьому етапі показник вологості зменшується до 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 2.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який встановлюють біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря складає 98%.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 2.6) через колектори подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-13, ІФ-19, ІФ-23) кожного з біореакторів до ТП 9.5, ТП 9.6, ТП 10.5, ТП 11.1. Кінцевий ступінь очистки повітря складає 99,999% та КУО – 0.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6%-го розчину HCl

ДР 3.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus IMB В-7241 у посівному апараті об'ємом 5 л

Для приготування 25 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 50 мл за допомогою мірного циліндра на 25 мл вносять 20,8 мл питної води та за допомогою піпетки на 5 мл при постійному перемішуванні вносять 4,2 мл 36%-ого розчину HCl. Рідини змішують у даному порядку, а не навпаки із метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Розчин не потребує стерилізації.

ДР 3.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus IMB В-7241 у посівному апараті об'ємом 50 л

Для приготування 60 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 100 мл за допомогою мірного циліндра на 50 мл вносять 50 мл питної води і вносять за допомогою піпетки на 10 мл при постійному перемішуванні 10 мл 36%-ого розчину HCl. Рідини змішують у даному порядку, а не навпаки із метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Розчин не потребує стерилізації.

ДР 3.1.3. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus IMB В-7241 у ферментері 0,5 м³

Для приготування 600 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 1 л за допомогою мірного циліндра на 500 мл вносять 500 мл питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 150 мл при постійному перемішуванні 100 мл 36%-ого розчину HCl. Рідини змішують у даному порядку, а не навпаки із метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Розчин не потребує стерилізації.

ДР 3.1.4. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища для вирощування B. subtilis БТ-2 у посівному апараті об'ємом 10 л

Для приготування 25 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 50 мл за допомогою мірного циліндра на 25 мл вносять 20,8 мл дистильованої води та за допомогою піпетки на 5 мл при постійному перемішуванні вносять 4,2 мл 36%-ого розчину HCl. Рідини змішують у даному порядку, а не навпаки із метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Розчин не потребує стерилізації.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus IMB B-7241 у посівному апараті об'ємом 5 л

Для приготування 25 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 1,5 г їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 50 мл і за допомогою мірного циліндра на 25 мл додають 25 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевим корком. Автоклавують при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus IMB B-7241 у посівному апараті об'ємом 50 л

Для приготування 60 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 3,6 г їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 150 мл і за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 60 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевим корком. Автоклавують при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus IMB B-7241 у ферментері об'ємом 0,5 м³

Для приготування 600 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 36 г їдкого натру. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1,5 л і за допомогою мірного циліндра на 500 мл додають 600 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевим корком. автоклавують при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.4. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища для вирощування B. subtilis БТ-2 у посівному апараті об'ємом 10 л

Для приготування 25 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 1,5 г їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 50 мл і за допомогою мірного циліндра на 25 мл додають 25 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення,

закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування і стерилізація запасних розчинів мікроелементів

*ДР 4.1. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 у колбах на качалці і посівних апаратах об'ємом 5 л та 50 л*

На технічних вагах зважують 1,1 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 г $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 г ЕДТА (трилон Б) та окремо на торсійних – 0,004 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,006 г H_3BO_3 ; 0,0001 г KI, поміщають у колбу місткістю 250 л, за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 100 мл дистильованої води, перемішують, стерилізують у автоклаві при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв. Даний розчин використовується надалі на стадіях ДР 7.2.1; ДР 7.3.2; ТП 9.4.

*ДР 4.2. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці і посівному апараті об'ємом 10 л*

На технічних вагах зважують 1,1 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 г $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 г ЕДТА (трилон Б) та окремо на торсійних – 0,004 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,006 г H_3BO_3 ; 0,0001 г KI, поміщають у колбу місткістю 250 л, за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 100 мл дистильованої води, перемішують, автоклавують при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв. Даний розчин використовується надалі на стадіях ДР 8.2.2; ТП 10.4.

ДР 5. Приготування і стерилізація запасних розчинів дріжджового автолізату

*ДР 5.1. Приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізату для вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 у колбах на качалці та посівному апараті об'ємом 5 л*

На технічних вагах зважують 5 г дріжджового автолізату. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води, відміряної мірним циліндром на 100 мл, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують

в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Даний розчин використовується надалі на стадіях ТП 9.4; ТП 9.5.

*ДР 5.2. Приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізату для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці*

На технічних вагах зважують 5 г дріжджового автолізату. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води, відміряної мірним циліндром на 100 мл, перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Даний розчин використовується надалі на стадії ТП 10.4.

ДР 6. Приготування і стерилізація запасного розчину глюкози

*ДР 6.1. Приготування і стерилізація запасного 40%-го розчину глюкози для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці*

На технічних вагах зважують 20 г глюкози. Наважку вносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра на 50 мл, перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують у автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Даний розчин використовується надалі на стадії ТП 10.4.

ДР 7. Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

*ДР 7.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у колбах на качалці.*

На даному етапі необхідно отримати 300 мл поживного середовища.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів та води для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці наведений у табл. 5.8. (підрозділ 5.8.1).

ДР 7.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,11 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 0,3 г NaCl та 0,03 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 750 л, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 250 мл дистильовану воду (0,2 л), перемішують, закривають ватно-марлевим корком і автоклавують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,18 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ та 0,04 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду (0,1 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і автоклавують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus ІМВ В-7241 в інокуляторі об'ємом 5 л

На даному етапі необхідно отримати 3 л поживного середовища.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів та води для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі (І-11) об'ємом 5 л наведений у табл. 5.9. (підрозділ 5.8.2).

ДР 7.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,1 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 3 г NaCl , 0,3 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,8 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ та 0,42 г KH_2PO_4 . Наважки переносять у реактор-змішувач (Р-9) на 5 л, вносять 3 мл стерильного розчину мікроелементів (від ДР 4.1), за допомогою мірного циліндра об'ємом 2,5 л питну воду (2,4 л), вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора-змішувача подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40°С. Отриманий розчин перекачують мембранним насосом (Н-10) у попередньо простерилізований інокулятор (І-11) об'ємом 5 л, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 3.1.1) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus ІМВ В-7241 в інокуляторі об'ємом 50 л

На даному етапі необхідно отримати 30 л поживного середовища.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів та води для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі (І-16) об'ємом 50 л наведений у табл. 5.10. (підрозділ 5.8.3).

ДР 7.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 7,5 г дріжджового автолізату, поміщають у колбу на 250 мл, додають 150 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра на 150

мл, перемішують до розчинення, закривають ватно-марлевым корком. Розчин дріжджового автолізу стерилізують в автоклаві при 112°C (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 7.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 10,5 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 30 г NaCl , 3 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ та 4,2 г KH_2PO_4 . Наважки переносять у реактор-змішувач (Р-14) на 50 л, вносять 30 мл стерильного розчину мікроелементів (від ДР 4.1), додають через лічильник (Д-12) 23,7 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора-змішувача подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40°C. Отриманий розчин перекачують мембранним насосом (Н-15) у попередньо простерилізований інокулятор (І-16) об'ємом 50 л, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 3.1.2) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту A. calcoaceticus IMB B-7241 для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,5 м³

На стадії виробничого біосинтезу необхідно отримати 300 л поживного середовища.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів та води для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері (ФР-29) об'ємом 0,5 м³ наведений у табл. 5.11. (підрозділ 5.8.4).

ДР 7.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 75 г дріжджового автолізу, поміщають у реактор-змішувач (Р-27) об'ємом 3 л, за допомогою мірного циліндра об'ємом 1,5 л дистильовану воду (1,5 л), вмикають перемішувальний пристрій. Розчин дріжджового автолізу стерилізують у реакторі-змішувачі (Р-27) при 112°C (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 7.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через ваговий дозатор (Д-17) у реактор-змішувач (Р-20) об'ємом 0,5 м³ вносять 105 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 300 г NaCl , 180 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, окремо на технічних вагах зважують 30 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 42 г KH_2PO_4 , 3,3 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,8 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г ЕДТА; 0,012 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,09 г $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 г H_3BO_3 та на

торсійних – 0,0003 г KI, наважки також переносять у реактор-змішувач (Р-20) на 0,5 м³, додають через лічильник (Д-18) 217 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора-змішувача подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40°C. Отриманий розчин перекачують мембранним насосом (Н-21) у попередньо простерилізований ферментер (ФР-29) об'ємом 0,5 м³, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 3.1.3) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 8. Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2

*ДР 8.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці*

На даному етапі необхідно отримати 600 мл поживного середовища.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів та води для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці наведений у табл. 5.14. (підрозділ 5.9.1).

ДР 8.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,21 г (NH₂)₂CO, 0,6 г NaCl та 0,06 г MgSO₄·7H₂O. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл дистильовану воду (0,5 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і автоклавують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 8.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,36 г Na₂HPO₄·12H₂O та 0,09 г KH₂PO₄. Наважки поміщають у колбу об'ємом 300 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл дистильовану воду (0,1 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 8.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2 в інокуляторі об'ємом 10 л*

На даному етапі необхідно отримати 6 л поживного середовища.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів та води для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі (І-26) об'ємом 10 л наведений у табл. 5.15. (підрозділ 5.9.2).

ДР 8.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,5 г дріжджового автолізу та 30 г глюкози. Наважки вносять у колбу об'ємом 200 мл, додають 50 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра на 50 мл, перемішують, колбу закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 8.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2,1 г $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 6 г NaCl, 0,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,6 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ та 0,84 г KH_2PO_4 . Наважки переносять у реактор-змішувач (Р-24) на 10 л, вносять 6 мл стерильного розчину мікроелементів (від ДР 4.2), додають через лічильник (Д-22) 4,7 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 °С. Отриманий розчин перекачують мембранним насосом (Н-25) у попередньо простерилізований інокулятор (І-26) об'ємом 10 л, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 3.1.4) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 9. Підготовка посівного матеріалу *A. calcoaceticus* IMB B-7241

*ТП 9.1. Підтримання колекційної культури *A. calcoaceticus* IMB B-7241*

Колекційну культуру *A. calcoaceticus* IMB B-7241 зберігають у пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі. Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

*ТП 9.2. Одержання робочої культури *A. calcoaceticus* IMB B-7241*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках із МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі із агаризованим м'ясо-пептонним середовищем в асептичних умовах. Вирощують у термостаті при температурі 28-30 °С упродовж 48 год.

*ТП 9.3. Вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у пробірках на агаризованих середовищах*

Отримані ізолювані колонії *A. calcoaceticus* IMB B-7241 із чашок Петрі (від ТП 9.2) в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки із скошеним агаризованим м'ясо-пептонним середовищем до ізолюваних колоній (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки), що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 48 год при температурі 28-30°C. Після вирощування відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 9.4. Вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у колбах на качалці

У асептичних умовах у колбу об'ємом 750 мл із композицією А (від ДР 7.1.1) вносять композицію Б (від ДР 7.1.2), додають за допомогою піпетки на 1 мл 0,3 мл запасного розчину мікроелементів (від ДР 4.1), додають за допомогою піпетки на 2 мл 1,5 мл запасного розчину дріжджового автолізату (від ДР 5.1), вносять за допомогою піпетки на 2 мл 1,5 мл відходів виробництва біодизелю, перемішують і в асептичних умовах розливають по 150 мл у качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку із робочою культурою *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (від ТП 9.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану із 1 пробірки.

Культивують на качалці (320 об/хв) при температурі 28-30°C упродовж 48 год, після чого визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 0,55 г/л, і здійснюють мікробіологічний контроль. Після чого культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 9.5. Вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в інокуляторі об'ємом 5 л

У посівний апарат (І-11) об'ємом 5 л із композицією А (від ДР 7.2.1) через засівну колбу вносять 15 мл запасного розчину дріжджового автолізату (від ДР 5.1) та 15 мл відходів виробництва біодизелю, вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 3.2.1) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0.

Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 8.4). Культивують при температурі 28-30°C і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20-30\%$ від насичення

повітря) упродовж 48 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год із інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 0,55 г/л.

*ТП 9.6. Вирощування інокуляту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в інокуляторі об'ємом 50 л*

У посівний апарат (I-16) об'ємом 50 л із композицією Б (від ДР 7.3.2) через засівну колбу вносять композицію А (від ДР 7.3.1) та 150 мл відходів виробництва біодизелю, вмикають перемішувач і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 3.2.2) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0.

Самоплином (рівень встановлення інокулятора (I-11) – 3,6 м) подають із інокулятора (I-12) посівний матеріал (від ТП 9.5). Культивують при температурі 28-30°C і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20-30\%$ від насичення повітря) упродовж 48 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год із інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 0,55 г/л.

ТП 10. Підготовка посівного матеріалу *B. subtilis* БТ-2

*ТП 10.1. Підтримання колекційної культури *B. subtilis* БТ-2*

Колекційну культуру *B. subtilis* БТ-2 зберігають у пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА). Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

*ТП 10.2. Одержання робочої культури *B. subtilis* БТ-2*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках із МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим м'ясо-пептонним середовищем в асептичних умовах. Вирощують у термостаті при температурі 28-30°C упродовж 24 год.

*ТП 10.3. Вирощування інокуляту *B. subtilis* БТ-2 у пробірках на агаризованих середовищах*

Отримані ізольовані колонії *B. subtilis* БТ-2 із чашок Петрі (від *ТП 10.2*) в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки із скошеним агаризованим м'ясо-пептонним середовищем до ізольованих колоній (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки), що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 24 год при температурі 28-30°C. Після вирощування відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

*ТП 10.4. Вирощування інокуляту *B. subtilis* БТ-2 у колбах на качалці*

У асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л із композицією А (від *ДР 8.1.1*) вносять композицію Б (від *ДР 8.1.2*) та за допомогою піпетки на 10 мл 7,5 мл запасного 40-% розчину глюкози (від *ДР 6.1*), додають за допомогою піпетки на 1 мл 0,6 мл запасного розчину мікроелементів (від *ДР 4.2*) та за допомогою піпетки на 5 мл 3 мл запасного розчину дріжджового автолізу (від *ДР 5.2*), перемішують і в асептичних умовах розливають по 150 мл у качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку із робочою культурою *B. subtilis* БТ-2 (від *ТП 10.3*) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану із 1 пробірки.

Культивують на качалці (320 об/хв) при температурі 28-30°C упродовж 24 год, після чого визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 0,55 г/л, і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

*ТП 10.5. Вирощування інокуляту *B. subtilis* БТ-2 в інокуляторі об'ємом 10 л*

У посівний апарат (І-26) об'ємом 10 л із композицією Б (від *ДР 8.2.2*) через засівну колбу вносять композицію А (від *ДР 8.2.1*), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від *ДР 3.2.4*) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0.

Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від *ТП 10.4*). Культивують при температурі 28-30°C і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20-30\%$ від насичення

повітря) упродовж 24 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря). Кожні 4 год із інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 0,55 г/л.

*ТП 10.6. Інактивація клітин *B. subtilis* БТ-2 в інокуляторі об'ємом 10 л*

Отриману культуральну рідину у інокуляторі (І-26) об'ємом 10 л (від ТП 10.5) стерилізують гострою парою при температурі 131°C протягом 1 год для отримання суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 як біологічного індуктора для виробничого біосинтезу.

ТП 11. Виробничий біосинтез *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

*ТП 11.1. Виробничий біосинтез *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у ферментері об'ємом 0,5 м³*

У виробничий ферментер (ФР-29) об'ємом 0,5 м³ із композицією Б (від ДР 7.4.2) із реактора-змішувача (Р-27) об'ємом 3 л самоплином (рівень встановлення реактора-змішувача (Р-27) – 3,6 м) подають композицію А (від ДР 7.4.1), із реактора-змішувача (Р-28) об'ємом 25 л самоплином (рівень встановлення реактора-змішувача (Р-28) – 3,6 м) подають 15 л відходів виробництва біодизелю. Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 3.2.3) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0. Із посівного апарата (І-26) об'ємом 10 л через трубу перетискання подають 6 л суспензії інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 (від ТП 10.6) та із інокулятора (І-16) посівний матеріал (від ТП 9.6).

Культивують при температурі 28-30°C і концентрації розчиненого кисню (pO_2 = 20-30 % від насичення повітря) протягом 72 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (1,1 г/л) та концентрації поверхнево-активних речовин (3,6 г/л).

Після закінчення процесу біосинтезу культуральну рідину перекачують мембранним насосом (Н-30) у цех виділення цільового продукту.

ЗВ 12. Знешкодження відходів

ЗВ 12.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів від ДР 1.3.1, ДР 1.3.2, ДР 1.4.1 утилізують, направляючи на очисні споруди.

ЗВ 12.2. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря від інокуляторів та ферментера (від ДР 1.4.3, ТП 9.5, ТП 9.6, ТП 10.5, ТП 11.1) відправляють у системи очищення повітряних відходів.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом процесу культивування кожні 4 год відбирають проби поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини для мікробіологічного контролю та для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації поверхнево-активних речовин (ПАР) та біомаси бактерій, контролю рівня джерела азоту $((\text{NH}_2)_2\text{CO})$ та джерела вуглецю (гліцерин) у середовищі для культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та контролю рівня джерела азоту $((\text{NH}_2)_2\text{CO})$ та джерела вуглецю (глюкози) у середовищі для культивування біологічного індуктора *Bacillus subtilis* БТ-2.

8.1. Мікробіологічний контроль

Оскільки культивування бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241 із метою одержання ПАР та *B. subtilis* БТ-2 із метою одержання суспензії інактивованих клітин проводяться у асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, щоб підтвердити відсутність сторонньої мікробіоти.

Мікробіологічний контроль здійснюють для контролю стерильності поживних середовищ для вирощування інокуляту і середовищ для біосинтезу цільового продукту та для виявлення сторонньої мікробіоти у посівному матеріалі та культуральній рідині під час біосинтезу. Контроль виконується шляхом відбору проби простерилізованого поживного середовища із подальшим її висівом на чашки Петрі із з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, із сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для дріжджів і грибів.

Підготовка чашок Петрі. Чашки Петрі стерилізують у сухожаровій шафі, поживне середовище розплавляють на киплячій водяній бані та розливають по 20-30 мл на чашку. Далі протягом 2-3 діб при температурі 30°C

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА			Літ.	Арк.	Акрушів	
Розробив	Благодир Д. О.									110	18
Консульт.											
Керівник	Пирог Т. П.							Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Зав. каф.	Стабніков В. П.										

чашки Петрі залишають кришками донизу після попереднього рівномірного застигання агару на рівній поверхні.

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл із об'єму проби піпеткою і нанесення її на поверхню поживного середовища. Суспензію розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки із посівами поміщають у термостат при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА. Аналіз посівів здійснюють, починаючи із 6...8 години. Після на поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту сторонніх мікроорганізмів [88].

Мікроскопіювання. На чисте предметне скло, знежирене спиртом і насухо протерте фільтрувальним папером, наносять краплю клітинної суспензії і рівномірно розподіляють петлею по склу (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують на повітрі, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за використання скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після мікроскопіювання імерсійний об'єктив очищують ватою із етиловим спиртом від залишків масла [89].

8.1.1. Мікробіологічний контроль *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Після вирощування штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на кров'яному агарі утворюються невеликі, кремового кольору, непрозорі, круглі, опуклі та гладенькі, з рівними краями колонії (рис. 2.4, див. підрозділ 2.3) [32, 90].

Якщо культура неконтамінована, при мікроскопіюванні можна спостерігати клітини *A. calcoaceticus*. Клітини паличкоподібні, розміри яких у експоненційній фазі росту становлять 1,0 – 1,5 мкм × 1,5 – 2,5 мкм, у стаціонарній – приймають переважну форму коків. Не мають джгутиків, хоча інколи у деяких штамів на щільних агаризованих поживних середовищах може спостерігатися непримітна «смикаюча рухливість» за рахунок полярних фімбрій, розташовуються попарно або у вигляді коротких ланцюжків, є грамнегативними (рис. 2.2, див. підрозділ 2.3) [32, 90].

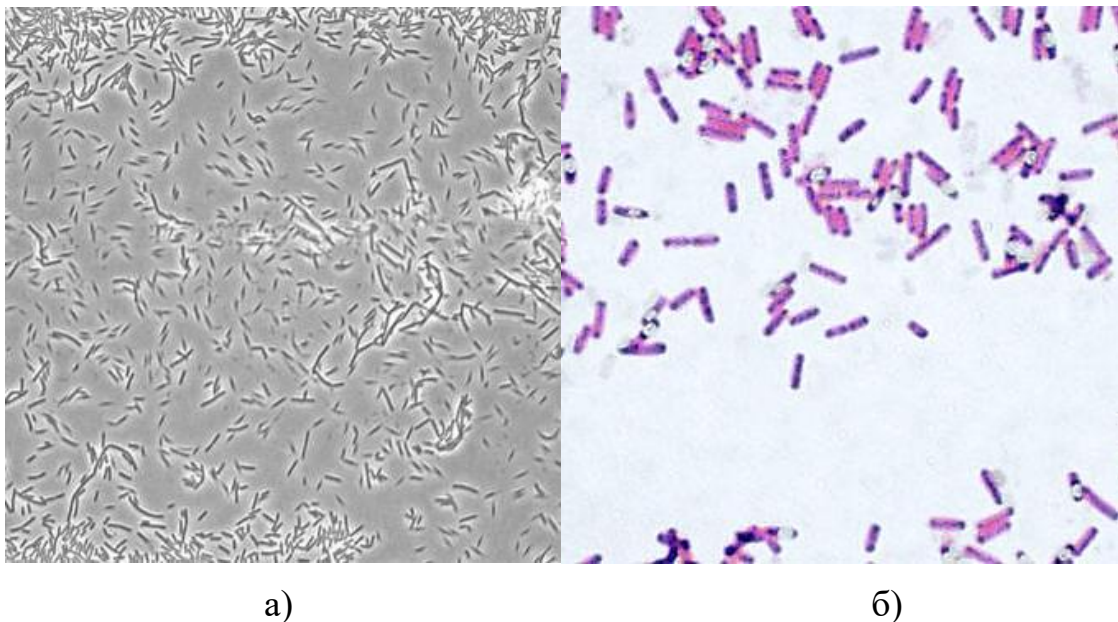
8.1.2. Мікробіологічний контроль біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2

Після вирощування штаму *B. subtilis* БТ-2 на Лурія-агарі отримують нечітко білого або злегка жовтого кольору, непрозорі, круглі та шорсткі, з нерівними краями колонії (рис. 8.1) [91].



Рис. 8.1. Колонії *B. subtilis* БТ-2 на Лурія-агарі [91]

Якщо культура неконтамінована, при мікроскопіюванні можна спостерігати клітини *B. subtilis* БТ-2 (рис. 8.2, а). Клітини паличкоподібні, розміри яких у стаціонарній фазі становлять $4,0 - 10 \text{ мкм} \times 0,25 - 1,0 \text{ мкм}$, наявні джгутики, розташовані перитрихально, є грампозитивними (рис. 8.2, б) [92].



а)

б)

Рис. 8.2. а – вигляд клітин *B. subtilis* БТ-2 із використанням фазово-контрастної мікроскопії [93]; б – клітини *B. subtilis* БТ-2, забарвлені позитивно за Грамом [94]

8.2. Визначення концентрації біомаси бактерій

Концентрацію біомаси встановлюємо непрямим методом за оптичною густиною клітинної суспензії, використовуючи фотоелектроколориметра (із довжиною

хвилі 540 нм). Отримані дані переводимо у розрахунку на суху біомасу клітин за калібрувальним графіком [95].

8.3. Визначення концентрації цільового продукту – ПАР

Кількість синтезованих позаклітинних ПАР (г/л) визначають гравіметрично після екстракції із культуральної рідини супернатанту сумішшю Фолча: хлороформ та метанол (2:1), використовуючи модифікований метод Блая-Даєра. Оскільки *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтезує комплекс полярних та неполярних ліпідів, а відомий метод Блая-Даєра, дає змогу виділяти в основному неполярні ліпіди, тому класична система розчинників (суміш Фолча) була модифікована додаванням до неї 1 М HCl (хлороформ–метанол–вода = 4:3:2). Така система дає змогу максимально повно виділяти як полярні, так і неполярні ліпіди.

Культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв) для відділення біомаси. 25 мл супернатанта переносять у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1 М HCl, воронку закривають пришліфованим корком і струшують упродовж 3 хв, далі додають ще 4 мл 1 М HCl й 16 мл суміші хлороформу та метанолу (2:1) і струшують протягом 5 хв. Отриману суміш залишають у воронці для розділення фаз, після нижню фракцію зливають (органічний екстракт 1), а водну фазу ще раз екстрагують. Під час повторної екстракції у водну фазу додають 9 мл 1М HCl, 16 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) і здійснюють екстракцію ліпідів упродовж 5 хв. Після розділення фаз збирають нижню фракцію (органічний екстракт 2). На третьому етапі до водної фази додають 25 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) і проводять екстракцію як описано вище, при цьому одержують органічний екстракт 3. Екстракти 1–3 об'єднують і упарюють на роторному випарнику IP-1M2 при температурі 50 °C за тиску (0,4 атм) до постійної маси [7].

Перед упарюванням екстракту пусту хімічно чисту круглодонну колбу упарюють до постійної маси із точністю до 0,001 г, якщо після зважування на аналітичних вагах маса колби не змінюється, отриманий екстракт обережно переливають у цю колбу та упарюють на роторному випарнику до повного випаровування розчинника. На стінках колби спостерігається сухий залишок, отриманий після упарювання екстракту, що і є грамами ПАР, кількість яких можна визначити, зваживши колбу із сухим

залишком на аналітичних вагах та віднявши її масу від маси пустої колби, визначену попередньо.

8.4. Визначення концентрації джерела Карбону (гліцерин) у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Концентрацію гліцерину у супернатанті можна визначити за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ, Shimadzu).

Приготування супернатанту. Для цього культуральну рідину центрифугують протягом 10 хв при 10°C і 4000 g у центрифугі Heraeus Megafuge.

Обладнання для ВЕРХ вміщує термостатичну колонку Aminex HPLC 87H, насос LC-20AD, автоматичний пробовідбірник SIC-20 AC, детектор показника заломлення RID-20A та підігрівача колонки CTO-20 AC. У якості рухомої фази використовують воду при швидкості потоку 0,6 мл/хв. Температуру колонки встановлюють на рівні 75 °C. Зовнішні стандарти готують із використанням різних концентрацій гліцерину [96].

8.5. Визначення концентрації джерела Карбону (глюкоза) у середовищі культивування біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2

Концентрацію глюкози у культуральній рідині можна визначити глюкозооксидазним методом.

Принцип методу. Метод базується на реакції окиснення глюкози до глюконової кислоти із утворенням пероксиду водню (H_2O_2), у присутності якого утворюються продукти хромогенного окиснення, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вихідній концентрації глюкози.

Приготування супернатанту. Для цього культуральну рідину центрифугують при 2500 об/хв, 10 хв.

10 мкл супернатанту змішують із 90 мкл реагенту, який містить 125 мг глюкооксидази, 0,5 мг пероксидази та 0,5 мл 1% розчину о-діанізидину у 95% етанолі, розчин набуває коричнево-оранжевого кольору за рахунок окиснення о-діанізидину. Після 10 хв витримки кольорового комплексу вимірюють його інтенсивність при довжині хвилі 620 нм за допомогою автоаналізатора [97, 98]. Зовнішні стандарти готують із використанням різних концентрацій глюкози.

8.6. Визначення концентрації джерела Нітрогену ($(NH_2)_2CO$) у середовищі

Концентрацію сечовини у культуральній рідині можна визначати спектрофотометричним методом, описаний Beale і Croft [99].

Принцип методу. Метод базується на реакції сечовини із діацилмонооксисимом і фенілантраніловою кислотою у присутності контрольованих кількостей окиснювача. Для сенсibiliзації реакції входять хлорид-іони, іони марганцю стабілізують отриманий колір, а фосфат дозволяє досягти розумної відтворюваності результатів [99].

Приготування супернатанту. Для цього культуральну рідину центрифугують при 5000 об/хв, 20 хв при 4°C. Отриманий супернатант фільтрують за допомогою фільтру із діаметром пор 0,22 мкм, а після розбавляють деіонізованою водою у 60 разів.

Супернатант змішують із реагентом діацетилмонооксим-фенілантранілової кислоти у співвідношенні 1:1 (1 об'єм діацетилмонооксиму 1% (мас./об.) у 0,02% оцтової кислоти та 1 об'єм фенілантранілової кислоти в 20% (об./об.) етанолі із 120 мМ NaCO₃).

Далі додають рівно 1 мл фосфатного буфера (1,3 М NaH₂PO₄, 10 мМ MnCl₂, 0,4 мМ NaNO₃, 0,2 М HCl у 31% (об./об.) H₂SO₄), з'являється фіолетове забарвлення. Потім реакційну суміш витримують у киплячій воді протягом 15 хв, фіолетове забарвлення поступово перетворюється у пурпурове. Після того, як пробірки охололи, вимірюють інтенсивність забарвлення при довжині хвилі 520 нм за допомогою спектрофотометра [100]. Потім роблять перерахунок на суху масу за допомогою калібрувального графіка.

8.7. Карта постадійного контролю

Для становлення відповідності готової продукції вимогам нормативно-технічної документації на підприємстві забезпечують постійний постадійний контроль процесу та готової продукції.

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю біосинтезу ПАР

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітродувка Висота забору повітря	—	Під час купівлі та при встановленні	H = 10 м
Кт 1.2 <i>Попереднє грубе очищення повітря</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 95%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	Охолоджене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-30°C, W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 <i>Очищення повітря у головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 98%
Кт, Км 1.7 <i>Очищення повітря у індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО - 0

1	2	3	4	5
Кх 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4 <i>Приготування розчину соляної кислоти</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
КТ, Кх, Км 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 <i>Приготування і стерилізація розчину натрію гідроксиду</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, час, температура, концентрація, стерильність	Манометр, годинник, термометр, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація після приготу- вання розчину, тривалість, тиск, темпера- туру безперер- вно під час сте- рилізації, мік- робіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131°C, C = 6%, відсутність мікробіоти
КТ, Км 3.1, 3.2 <i>Приготування і стерилізація запасних розчинів мікроелементів для вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємами 5, 50 і 10 л</i>	Розчин мікроелементів Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, темпера- туру безперер- вно під час сте- рилізації, мік- робіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131°C, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.1, 4.2 <i>Приготування і стерилізація запасних розчинів дріжджового автолізу для виращування інокуляту у колбах на качалці та посівному апараті об'ємом 5 л</i>	Розчин дріжджового автолізу Тиск, час, температура, сте- рильність	Манометр, годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, темпера- туру безперер- вно під час сте- рилізації, мік- робіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, t = 112°C, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.1 <i>Приготування і стерилізація запасного розчину глюкози для виращування інокуляту у колбах на качалці</i>	Розчин глюкози Тиск, час, температура, концентрація, стерильність	Манометр, годинник, термометр, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація після приготу- вання розчину, тривалість, тиск, темпера- туру безперер- вно під час сте- рилізації, мік- робіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, t = 112°C, C = 40%, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 6.1.1, 7.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту</i> <i>A. calcoaceticus</i> IMB В-7241 та <i>B. subtilis</i> БТ-2 у колбах на качалці. <i>Приготування і стерилізація композиції</i> <i>А</i>	Композиція А Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t = 131^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1.2, 7.1.2 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту</i> <i>A. calcoaceticus</i> IMB В-7241 та <i>B. subtilis</i> БТ-2 у колбах на качалці. <i>Приготування і стерилізація композиції</i> <i>Б</i>	Композиція Б Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t = 131^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 6.2.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту</i> <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 у посівному апараті об'ємом 5 л. <i>Приготування і стерилізація композиції</i> <i>A</i>	Композиція А Тиск, час, температура, рН, стерильність	Манометр, годинник, термометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура, рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131°C, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.3.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту</i> <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 у посівному апараті об'ємом 50 л. <i>Приготування і стерилізація композиції</i> <i>A</i>	Композиція А Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, t = 112°C, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 6.3.2 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту</i> <i>A. calcoaceticus</i> IMB В-7241 у посівному апараті об'ємом 50 л. <i>Приготування і стерилізація композиції</i> <i>Б</i>	Композиція Б Тиск, час, температура, рН, стерильність	Манометр, годинник, термометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура, рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131°C, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту</i> <i>A. calcoaceticus</i> IMB В-7241 для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,5 м³. <i>Приготування і стерилізація композиції</i> <i>А</i>	Композиція А Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, t = 112°C, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 6.4.2, Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>A. calcoaceticus</i> IMB В-7241 для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,5 м³. Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, час, температура, рН, стерильність	Манометр, годинник, термометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура, рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131°C, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 7.2.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>B. subtilis</i> БТ-2 у посівному апараті об'ємом 10 л. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, час, температура, концентрація, стерильність	Манометр, годинник, термометр, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація після приготування розчину, тривалість, тиск, температуру безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р = 0,05 МПа, τ = 30 хв, t = 112°C, С = 40%, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 7.2.2 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>B. subtilis</i> БТ-2 у посівному апараті об'ємом 10 л.</i> <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, температура, рН, стерильність	Манометр, годинник, термометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск, температура, рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131°C, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км 8.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB В-7241 температура, час зберігання, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль кожні 3-4 місяці	t = 2–4 °C, τ = 3–4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB В-7241 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 28-30 °C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 8.3 <i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i>	Робоча культура <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 28-30 °C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.4 <i>Вирощування культури у колбах на качалці</i>	Посівний матеріал <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 температура, час, швидкість перемішування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів мішалки автоматично під час вирощування, концентрація біомаси і мікробіологічний контроль після вирощування	t = 28-30 °C, τ = 48 год, w = 320 об/хв, Cб = 0,55 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 8.5, 8.6 <i>Вирощування культури в інокуляторах об'ємом 5 та 50 л</i>	Посівний матеріал <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО ₂ , ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню автоматично під час вирощування, концентрація біомаси і мікробіологічний контроль кожні 4 год і після культивування	t = 28-30°C, τ = 48 год, рО ₂ = 20-30%, Сб = 0,55 г/л, рН = 6,8 – 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 9.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 температура, час зберігання, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль кожні 3-4 місяці	t = 2–4 °С, τ = 3–4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 9.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 28-30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 8.1

1	2	3	4	5
КТ, Км 9.3 <i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i>	Робоча культура <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 28-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
КТ, Км 9.4 <i>Вирощування культури у колбах на качалці</i>	Посівний матеріал <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 температура, час, швидкість перемішування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів мішалки автоматично під час вирощування, концентрація біомаси і мікробіологічний контроль після вирощування	$t = 28-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $w = 320$ об/хв, $C_b = 0,55$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 9.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Посівний матеріал <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО₂, ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню автоматично під час вирощування, концентрація біомаси і мікробіологічний контроль кожні 4 год і після культивування	t = 28-30°C, τ = 24 год, pO₂ = 20-30%, Cб = 0,55 г/л, рН = 6,8 – 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 9.6 <i>Інактивація культури в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Суспензія інактивованих клітин <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 Температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час під час інактивації клітин, мікробіологічний контроль після інактивації клітин	t = 131°C, τ = 1 год, відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км, Кх 10.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 0,5 м³</i>	Культуральна рідина Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, концентрація ПАР, мікробіологічна чистота	Датчик температури, рН, рО₂, годинник, тахометр, ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню автоматично під час вирощування, концентрації біомаси, ПАР і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування	t = 28-30 °С, τ = 72 год, рО₂ = 20-30%, Сб = 1,1 г/л, СПАР = 3,6 г/л, рН = 6,8 – 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

На сьогодні доволі масштабною екологічною проблемою сучасності є проблема поводження з відходами, які є невід’ємною частиною кожного виробництва і потребують правильної утилізації, оскільки можуть становити небезпеку не лише для людини або тварин, а й для навколишнього середовища в цілому. Основні причини проблеми поводження з відходами будь-якого виробництва полягають у недостатній увазі до екологічних аспектів під час розробки та виробництва продукту, недостатньому застосуванні технологій очищення та переробки відходів, недостатньому контролю за викидами та використанням вторинної сировини.

У виробництві комплексу поверхнево-активних речовин (ПАР), синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ-2 як біологічного індуктора у середовищі культивування з відходами виробництва біодизелю [7], найбільшу частину відходів складають саме газоподібні та рідкі, меншу – тверді, відповідно до чого будуть запропоновані відповідні методи та устаткування для їх утилізації.

9.1. Характеристика та розрахунок об’ємів рідких відходів виробництва ПАР

При виробництві комплексу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, за наявності біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2 у середовищі культивування, утворюються рідкі відходи у вигляді стічних вод, основними місцями емісії яких є: санітарна підготовка виробництва та побутові стічні води. Враховуємо, що під час щоденного та генерального прибирань приміщень використовують такі мийно-дезінфікуючі засоби як «Бактодез», «Санітаб», «Фамідез® комбі», «ДЕЗОлайт», а також здійснюється миття резервуарів обладнання за

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розробив		Благодир Д. О.			АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА			Літ.	Арк.	Акрушів	
Консульт.									129	7	
Керівник		Пирог Т. П.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Зав. каф.		Стабніков В. П.									

допомогою СІР-мийки при використанні мийно-дезінфікуючого засобу «Стериокс» та «КлінДез 401», які після виконання процесу разом із промивними водами зливаються у каналізацію. До того ж до складу стічних вод можуть входити залишки культуральної рідини з біомасою як продуцента, так й індуктора, тому при виборі методу очищення необхідною умовою є можливість видалення як органічних, так і неорганічних забруднень.

Розрахуємо теоретичну кількість утворюваних стічних вод на кожній стадії процесу за рік. Кількість води, яка необхідна для проведення миття обладнання залежить від способу його здійснення, до наприклад, при використанні СІР-мийки процес миття проходить на порядки швидше та з меншою кількістю витрат мийно-дезінфікуючих розчинів з можливістю повторного використання даних розчинів після їх фільтрування. Частина стічних вод при використанні СІР-мийки становить приблизно 1/3 від об'єму обладнання, що миється, за ручного миття – 1/2 [101]. Зауважимо, що при підготовці реакторів для змішування компонентів поживного середовища буде здійснюватися ручне миття, а для підготовки інокуляторів та виробничого ферментеру будуть встановлені станції СІР-мийки. Відповідно до цього, кількість стічних вод за допомогою СІР-мийки буде становити:

$$(5 \text{ л} \cdot 0,3) + (10 \text{ л} \cdot 0,3) + (50 \text{ л} \cdot 0,3) + (500 \text{ л} \cdot 0,3) = 169,5 \text{ л}$$

Кількість стічних вод за допомогою ручного миття буде становити:

$$(3 \text{ л} \cdot 0,2) + (5 \text{ л} \cdot 0,2) + (10 \text{ л} \cdot 0,2) + (25 \text{ л} \cdot 0,2) + (50 \text{ л} \cdot 0,2) + (500 \text{ л} \cdot 0,2) = 118,6 \text{ л}$$

Отже, загальна кількість стічних вод складає:

$$169,5 \text{ л} + 118,6 \text{ л} = 288,1 \text{ л}$$

Виробництво ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 здійснюється протягом 50 робочих трудоднів, що включає 15 циклів культивування, тому річний об'єм стічних вод:

$$288,1 \text{ л} \cdot 15 \text{ л} = 4321,5 \text{ л} = 4,32 \text{ м}^3$$

Розрахуємо середні витрати побутових стічних вод за зміну, що надходять від підприємства:

$$Q_n = q_n \cdot N = 0,025 \text{ м}^3/(\text{зм люд}) \cdot 8 \text{ люд} = 0,2 \text{ м}^3/\text{зм},$$

де q_n – норма відводу побутових стічних вод в $\text{м}^3/\text{зм}$ на одного робітника, яку приймають для гарячих цехів $0,045 \text{ м}^3/(\text{зм люд})$, для холодних – $0,025 \text{ м}^3/(\text{зм люд})$; N – кількість робітників, які працюють в зміну [101].

Одна зміна триває 12 годин, тому для забезпечення річної потреби ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 виробництво працюватиме:

$$2 \text{ зм/добу} \cdot 50 \text{ трудоднів} = 100 \text{ змін}$$

Тоді кількість утворюваних побутових стічних вод за один рік складе:

$$0,2 \text{ м}^3/\text{зм} \cdot 100 \text{ зм} = 20 \text{ м}^3$$

Підсумовуючи вище описані розрахунки, у результаті виробництва комплексу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, за наявності біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2 у середовищі культивування продуцента, за рік буде утворюватися 24,32 м³ стічних вод.

9.1.1. Утилізація рідких відходів виробництва ПАР

Використання біореакторів для очищення стічних вод досить поширене по всьому світу. Він працює на принципі створення умов для розвитку та розмноження мікроорганізмів, що здатні розкладати забруднення в стічній воді. У біореакторі стічна вода протікає через зрошувачі з нанесеними на них біологічними плівками або тканинами, на яких ростуть бактерії та інші мікроорганізми, що здатні до очищення води. Цей метод очищення води вважається одним з найефективніших та екологічно безпечних, оскільки він дозволяє знизити рівень забруднення водних ресурсів та знижує викиди шкідливих речовин у навколишнє середовище. Біореактори застосовуються як у малих місцевих очисних спорудах, так і великих міських системах очищення стічних вод. Особливо активно вони використовуються в Європі та Північній Америці, де законодавство та нормативні акти ставлять високі вимоги до якості очищення стічних вод.

Біореактори, що використовуються в даний час для водоочищення, можуть мати різні технологічні структури, що відрізняються наявністю або відсутністю аеробних, аноксидних та анаеробних зон, їх кількістю та розташуванням, напрямом рециклів. Переваги використання біореакторів для очищення стічних вод полягають у тому, що вони є більш ефективними та економічними за порівнянням з традиційними методами очищення води. Крім того, вони можуть бути використані для очищення великих обсягів стічної води у промислових підприємствах з високим рівнем забруднення води [102, 103].

Зважаючи на новітні розробки саме щодо інтенсифікації біохімічного очищення стічних вод, а також поширеність даного методу у багатьох галузях промисловості, розглянемо механіко-біологічну очисну станцію із застосуванням інтегрованого активованого мулу з текстильним шаром для біологічного очищення стічних вод при виробництві комплексу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (рис. 9.1) [104].

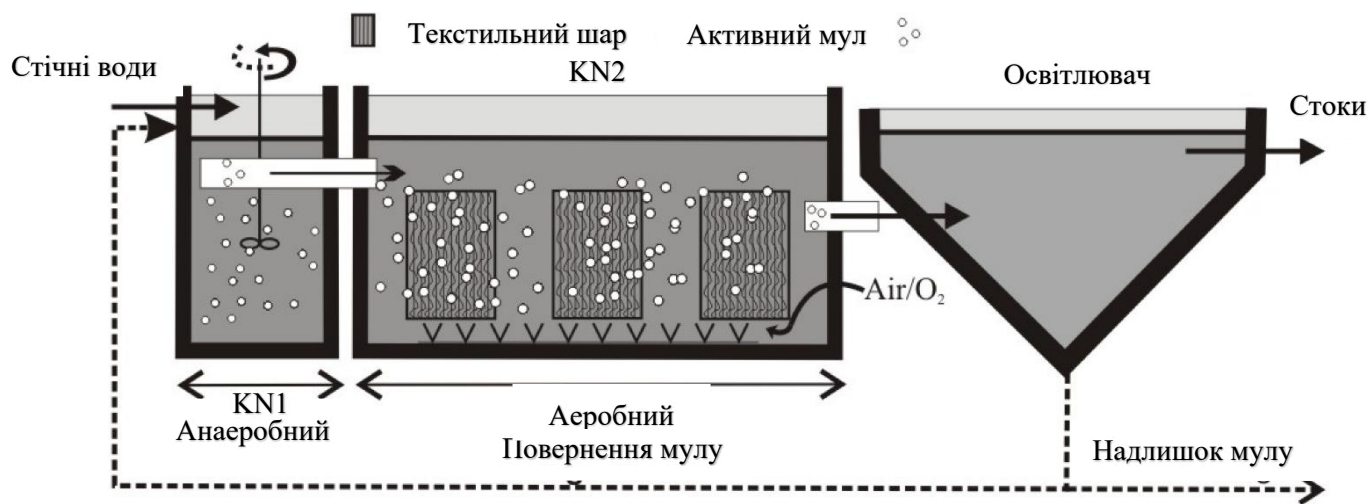


Рис. 9.1. Спрощена схема очисної станції із застосуванням інтегрованого активованого мулу з текстильним шаром для біологічного очищення стічних вод [104]

Процес біологічного очищення стічних вод починається в камерах реактора ВІО І. Реактор складається з восьми камер: вирівнювальної ємності, двох камер дефосфатації, трьох камер денітрифікації, стабілізаційної ємності та накопичувальної ємності. Стічні води з реактора ВІО І надходять у два реактори ВІО ІІ (позначені як KN1 і KN2). В одному реакторі ВІО ІІ є дві окремі камери; перша функціонує як камера нітрифікації та денітрифікації, тоді як друга (основна) камера є виключно нітрифікаційною (аеробною). Надлишок мулу з реактора ВІО ІІ рециркулює в першу камеру денітрифікації в реакторі ВІО І. Після процесів очищення в реакторах ВІО ІІ стічні води з камери нітрифікації по відкритих каналах транспортуються до двох радіальних вторинних відстійників (освітлювачів), в яких відбувається процес седиментації. Звідти вторинний мул повертається в камеру попередньої денітрифікації або резервуар стабілізації в реакторі ВІО І [104].

9.2. Характеристика та розрахунок газоповітряних відходів виробництва ПАР

До складових газоповітряних відходів виробництва ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 належать вуглекислий газ і аерозоль, які утворюються під час таких процесів

як підготовка посівного матеріалу продуцента й індуктора *B. subtilis* БТ-2 та виробничий біосинтез. Враховуючи те, що використані інокулятори та ферментер відносяться до лабораторних та пілотних установок, у своєму оснащенні вони мають вбудовані фільтри для очищення відпрацьованого повітря, що виключає необхідність у додатковому їх встановленні.

Для знешкодження газоподібних продуктів життєдіяльності спершу розрахуємо кількість відпрацьованого повітря, яке приблизно відповідає витратам аераційного. Продуктивність установки очищення повітря буде обрана саме по кількості утворюваних відходів на етапі виробничого біосинтезу, так як їх кількість буде найбільшою. Відомо, що кількість аераційного повітря, що подається у ферментер (інокулятори) варіюється від 1,0 до 2,0 об'ємів повітря на 1 об'єм поживного середовища за хвилину ($\text{м}^3 \text{ повітря} / \text{м}^3 \text{ ПС} \cdot \text{хв.}$) [57]. З даного діапазону оберемо співвідношення об'єму повітря до об'єму поживного середовища як 2:1 відповідно.

Об'єм культуральної рідини при виробничому біосинтезі складає 300 л, тому:

$$300 \text{ л} \cdot 2 = 600 \text{ л повітря/хв}$$

$$600 \text{ л} \cdot 60 = 36\,000 \text{ л повітря/год або } 36 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$$

Отже, продуктивність установки для очистки повітря повинна бути не менша $36 \text{ м}^3 \text{ повітря/год}$, для ефективної утилізації газоподібних продуктів життєдіяльності продуцента.

9.2.1. Утилізація газоповітряних відходів виробництва ПАР

Утилізацію газоповітряних відходів можна здійснити за допомогою електростатичних фільтрів (ESP). Це електричні пристрої для контролю за твердими частинками диму та інших газоподібних забруднюючих речовин. Газоподібні відходи пропускають через збірні пластини під високою напругою (від 30 000 до 100 000 вольт), завдяки чому зваженим частинкам надається негативний електричний заряд. Ці негативно заряджені частинки мігрують до позитивно заряджених збірних пластин. Під час збирання заряд нейтралізується, а частинки видаляються промиванням або дією сили тяжіння. Електростатичні фільтри надзвичайно ефективні (99%), оскільки вони можуть видаляти частинки мікронного розміру, а також є досить простими в обслуговуванні [105].

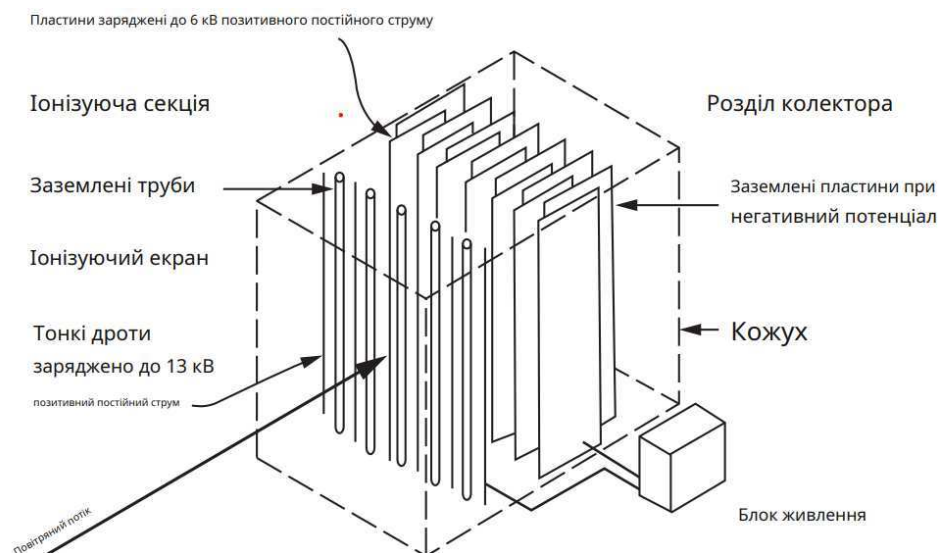


Рис. 9.2. Схематичне зображення електростатичного фільтру [106]

Електростатичний фільтр (рис. 9.2.) має дві основні секції. Перша — це іонізуюча секція, яка складається із серії тонких проводів, заряджених напругою до 13 кВ, розміщених поперемінно із заземленими стрижнями. Це створює коронний розряд, і коли частинки в повітрі проходять через іонізуюче поле, вони отримують позитивний електростатичний заряд. Друга частина — це колекторна секція, який складається з ряду паралельних вертикальних металевих пластин із різницею потенціалів 6–7 кВ між сусідніми пластинами. Іонізовані частинки пилу притягуються до цих пластин, до яких вони прилипають. Пластини іноді покривають маслом, щоб допомогти утримувати пил. Фільтри очищаються автоматично шляхом промивання водою під високим тиском [106].

9.3. Характеристика та утилізація твердих відходів виробництва ПАР

Під час приготування мийно-дезінфікуючих засобів та пакування деяких компонентів поживних середовищ використовуються відповідні пакувальні тари, а саме: тара для мийно-дезінфікуючих засобів має вигляд каністри із поліпропілену, яка піддається вторинній переробці; для пакування певних компонентів поживних середовищ використовують такий матеріал як полівінілхлорид (ПВХ), який неможливо утилізувати з іншими типами пластику, який піддається вторинній переробці.

Для утилізації пакувальних тар мийно-дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища їх попередньо піддають сортуванню за видами пластику, а згодом відправляють до пунктів прийому вторинної сировини. Відокремлення

пластику за його видом та властивостями допомагає забезпечити більш ефективну та економічну переробку вторинної сировини.

Зважаючи на те, що при мікробіологічному контролі виробничого процесу, який здійснюється кожні 4 години, утворюються органічні відходи у вигляді біомаси та залишків поживних середовищ, вони також потребують знешкодження. Для їх утилізації застосуємо метод автоклавування, основною перевагою якого є його здатність переробляти великі обсяги біомаси та відходів швидко та ефективно [103].

РОЗДІЛ 10

НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЄКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

Технологічний процес біосинтезу комплексу поверхнево-активних речовин (ПАР) на основі бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 складається із допоміжних та основних робіт. Так до стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища, приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів, приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу. До стадій технологічного процесу (ТП) відносять: приготування посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

Крім того, технологічна схема передбачає приготування біологічного індуктора – суспензії інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ-2, яка також, складається із допоміжних робіт (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища, приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів, приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу, приготування і стерилізація запасного розчину глюкози) та основних (приготування посівного матеріалу).

Перелік нормативно-технічної документації та науково-технічної літератури для регламентування відповідних аспектів інженерної діяльності при біосинтезі ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 наведено у табл. 10.1:

					НУХТ БТЕК 04.02.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Благодир Д. О.				НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЄКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							136	5
Керівник	Пирог Т. П.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В. П.							

Таблиця 10.1

Перелік нормативно-технічної документації та науково-технічної літератури із зазначенням етапів її використання

№	Нормативно-технічна документація та науково-технічна література	Використання у технологічному процесі	Стадія технологічного процесу	Позиція на апаратурній схемі
ДСТУ				
1	ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосування (ISO 14001:2015, IDT).	Використовується на етапі розробки та реалізації екологічної політики, при створенні критеріїв та системи екологічного контролю виробництва, при розробці програми внутрішнього аудиту, для підвищення екологічної дієвості.	Всі стадії.	—
2	ДСТУ ISO 45001:2019 Системи управління охороною здоров'я та безпекою праці. Вимоги та настанови щодо застосування (ISO 45001:2018, IDT).	Використовується на етапі встановлення заходів для унеможливлення або зменшення ризиків у сфері охорони здоров'я та безпеки праці, для підтримки й захисту фізичного та психічного здоров'я, добробуту працівників, при забезпеченні безпечних і здорових умов праці на робочому місці.	Всі стадії.	—
3	ДСТУ ISO 50001:2020 Системи енергетичного менеджменту. Вимоги та настанова щодо використання (ISO 50001:2018, IDT).	Використовується на етапі створення систем і процесів необхідних для постійного поліпшення енергетичної результативності, охоплюючи енергетичну ефективність, використання та споживання енергії, при розробленні енергетичної політики, цілей, енергетичних завдань і планів дій, що стосуються енергетичної ефективності організації, при створенні групи енергетичного менеджменту, для підтримки роботоздатності інфраструктури.	Всі стадії.	—

4	ДСТУ ISO 9001:2015 Системи управління якістю. Вимоги (ISO 9001:2015, IDT).	Використовується на етапі поліпшення загальної діяльності організації та забезпечення міцної основи щодо сталого розвитку, для урахування ризиків і можливостей, пов'язаних із середовищем і цілями організації, для підвищення задоволеності замовників, для процесного підходу під час розробляння, запровадження та поліпшування результативності системи управління якістю.	Всі стадії.	—
5	ДСТУ ISO 26000:2019 Настанови щодо соціальної відповідальності (ISO 26000:2010, IDT).	Використовується на етапі оцінки результатів діяльності організації у сфері соціальної відповідальності для її підвищення, при розробці способів інтеграції соціально відповідальної поведінки в організацію, при вирішенні таких проблем як запобігання забруднень, сталого ресурсо користування, пом'якшень змін клімату та адаптації до нього тощо.	Всі стадії.	—
Наукові статті				
6	Пирог Т.П., Іванов М.С., Ярова Г.А. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів. Наукові праці НУХТ. 2021, 27(4): 43-52. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-4-6.	Використовується на етапі синтезу та виділення цільового продукту поверхнево-активних речовин (ПАР) та створення умов культивування.	ТП 8 ТП 9 ТП 10	I-11 I-16 I-26 ФР-29

Продовження табл. 10.1

7	Lopar M, Spoljaric IV, Cepanec N, Koller M, Braunegg G, Horvat P. Study of metabolic network of <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis. <i>Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology</i> . 2014, 41(6): 913-930. doi: 10.1007/s10295-014-1439-y.	Використовується на етапі визначення концентрації джерела Карбону (гліцерину) у культуральній рідині.	ТП 8.4 ТП 8.5 ТП 8.6 ТП 10.1	I-11 I-16 ФР-29
8	Huggett A.S.G., Nixon, D.A. Use of glucose oxidase, peroxidase, and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. <i>The Lancet</i> . 1957, 270(6991): 368-370. doi:10.1016/s0140-6736(57)92595-3.	Використовується на етапі визначення концентрації джерела Карбону (глюкози) у культуральній рідині.	ТП 9.4 ТП 9.5	I-26
9	Beale R.N., Croft D. A sensitive method for the colorimetric determination of urea. <i>Journal of Clinical Pathology</i> . 1961, 14(4): 418-424. doi:10.1136/jcp.14.4.418.	Використовується на етапі визначення концентрації джерела Нітрогену (сечовини) у культуральній рідині.	ТП 8.4 ТП 8.5 ТП 8.6 ТП 9.4 ТП 9.5 ТП 10.1	I-11 I-16 I-26 ФР-29
Методичні рекомендації				
10	Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.	Використовується на етапі здійснення хімічного, технологічного та мікробіологічного контролю виробництва.	На усіх етапах.	На усіх позиціях.

Закінчення табл. 10.1

11	Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.	Використовується на етапі визначення концентрації біомаси бактерій.	ТП 8.4 ТП 8.5 ТП 8.6 ТП 9.4 ТП 9.5 ТП 10.1	I-11 I-16 I-26 ФР-29
12	Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проєкту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.	Використовується на усіх етапах розробки курсового проєкту.	На усіх етапах.	На усіх позиціях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adetunji AI, Olaniran AO. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi J Biol Sci.* 2021, 28(1): 669-679. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.058.
2. Siebenhaller S. Enzymatic synthesis of glycolipid surfactants: Dis. dr. tech. science. Markdorf, 2019. 166 p.
3. Cameotra S.S., Makkar R.S., Kaur J., Mehta S.K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2010, 672: 261-280. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_20
4. Eras-Muñoz E, Farré A, Sánchez A, Font X, Gea T. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered.* 2022, 13(5): 12365-12391. doi: 10.1080/21655979.2022.2074621.
5. Matvyeyeva O.L., Vasylchenko O.A., Aliieva O.R. Microbial biosurfactants role in oil products biodegradation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation.* 2014, 2(2): 69-74. doi:10.12691/ijebb-2-2-4
6. Maganaa M., Seretia C., Ioannidisa A., Mitchell C. A., Balle A. R., Magiorkinis E., etc. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018, 31(3). pii: e00084-16. doi: 10.1128/CMR.00084-16.
7. Пирог Т.П., Іванов М.С., Ярова Г.А. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів. *Наукові праці НУХТ.* 2021, 27(4): 43-52. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-4-6
8. Moshtagh, B., Hawboldt, K., & Zhang, B. Biosurfactant production by native marine bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* 2021, 1-12. doi:10.1002/cjce.24254
9. Janek, T., Gudiña, E.J., Połomska, X., Biniarz, P., Jama, D., Rodrigues, L.R., etc. Sustainable surfactin production by *Bacillus subtilis* using crude glycerol from different wastes. *Molecules.* 2021, 26(12): 3488. doi: 10.3390/molecules26123488
10. Sousa, M. de, Dantas, I. T., Felix, A. K. N., Sant'Ana, H. B. de, Melo, V. M. M., Gonçalves, L. R. B. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant

production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014, 57(2): 295-301. doi:10.1590/s1516-89132014000200019

11. Eraqi, W. A., Yassin, A. S., Ali, A. E., & Amin, M. A. Utilization of crude glycerol as a substrate for the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Research International*. 2016, 2016: 1-9. doi:10.1155/2016/3464509

12. Bharali P., Singh S.P., Dutta N., Gogoi S., Bora L.C., Debnath P. etc. Biodiesel derived waste glycerol as an economic substrate for biosurfactant production using indigenous *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*. 2014, 4(73): 38698-38706. doi:10.1039/c4ra05594b

13. Garlapati V.K., Shankar U., Budhiraja A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnol. Rep.* 2015, 9: 9-14. doi:10.1016/j.btre.2015.11.002.

14. Pirog T.P., Antonyuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009, 45(3): 272–278. doi:10.1134/S0003683809030065

15. Pirog T.P., Sidor I.V., Lutsai D.A. Calcium and magnesium cations influence on antimicrobial and antiadhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. *Biotechnologia Acta*. 2016, 9(6): 50-57. doi:10.15407/biotech9.06.050

16. Пирог Т.П., Конон А.Д. Мікробні поверхнево-активні речовини. І. Гліколіпіди. *Biotechnologia Acta*. 2014, 7(1): 9-30.

17. Пирог Т.П., Луцай Д.А., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О., Ельперін І.В. Антимікробна та антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на технічному гліцерині. *Мікробіологічний журнал*. 2018, 80(2): 14-27. doi:10.15407/microbiolj80.02.014

18. Патент України на винахід № 126271. Спосіб одержання комплексного мікробного препарату / Пирог Т.П., Леонова Н.О., Гаврилкіна Д.В., Антонюк С.І., Луцай Д.А. Опубл. 25.10.2018, Бюл. №20.

19. Пирог Т.П., Савенко І.В., Луцай Д.А., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О. Роль поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 у руйнуванні біоплівки. *Мікробіологічний журнал*. 2017, 79(4): 21-29.

20. Pirog T.P., Konon A.D., Savenko I.V. Microbial surfactants in environmental technologies. *Biotechnologia Acta*. 2015, 8(4): 21-39. doi: 10.15407/biotech8.04.021
21. Pirog T.P., Shulyakova M.O., Nikituk L.V., Antonuk S.I., Elperin I.V. Industrial waste bioconversion into surfactants by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405. *Biotechnologia Acta*. 2017, 10(2): 22-33. doi: 10.15407/biotech10.02.022
22. Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А., Савенко І.В., Іутинська Г.А. Синтез фітогормонів бактеріями *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 – продуцентами поверхнево-активних речовин. *Серія біологічних наук*. 2016, № 1: 90-95.
23. Пирог Т.П., Палійчук О.І., Іутинська Г.О., Шевчук Т.А. Перспективи використання мікробних поверхнево-активних речовин у рослинництві. *Мікробіологічний журнал*. 2018, 80(3): 115-134. doi: 10.15407/microbiolj80.03.115
24. Pirog T.P., Lutsai D.A., Muchnyk F.V. Biotechnological potential of the *Acinetobacter* genus bacteria. *Microbiological Journal*. 2021, 83(3): 65-82.
25. Banat I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R., Nyayanit N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*. 2014, 5(697): 1-19. doi:10.3389/fmicb.2014.00697
26. Coleman NV, Mattes TE, Gossett JM, Spain JC. Biodegradation of cis-dichloroethene as the sole carbon source by a beta-proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(6): 2726-2730. doi:10.1128/AEM.68.6.2726-2730.2002
27. Kumar L.R., Yellapu S.K., Tyagi R.D., Zhang X. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresource Technology*. 2019, 293: 122155. doi:10.1016/j.biortech.2019.122155
28. *Acinetobacter calcoaceticus*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Acinetobacter_calcoaceticus
29. *Acinetobacter calcoaceticus* bacteria. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sciencephoto.com/media/10926/view>

30. Gram-negative *Acinetobacter calcoaceticus* bacterium. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.gettyimages.dk/detail/news-photo/this-gram-stained-photomicrograph-depicts-numerous-gram-news-photo/509391900?adppopup=true>
31. Encyclopædia Britannica, Inc. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://kids.britannica.com/students/assembly/view/708>
32. *Acinetobacter*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://fr.slideshare.net/alfredobambang/acinetobacter-28595602>
33. *Acinetobacter calcoaceticus*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Acinetobacter_calcoaceticus/
34. Hrenovi J., Tiblja D., Büyükgüngör H., Orhan Y. Influence of support materials on phosphate removal by the pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Food Technol. Biotechnol.* 2003, 41(4): 331-338.
35. Kämpfer P. *Acinetobacter*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014, 1: 11-17. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00002-1
36. OECD. Information used in the assessment of environmental applications of *Acinetobacter*. In: Safety Assessment of Transgenic Organisms. Volume 4: OECD Consensus Documents. 2010, 148-230. doi:10.1787/9789264096158-7-en
37. List of Prokaryotic with Standing in Nomenclature. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.bacterio.net/>
38. Bjerk T.R., Severino P., Jain S., Marques C., Silva A.M., Pashirova T., Souto E.B. Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. *Bioengineering (Basel)*. 2021, 8(8): 115. doi: 10.3390/bioengineering8080115.
39. Dixit, S., Danekar, R., and Prasad, E. Surfactants market outlook – 2027. *Allied Mark. Res.* 2020
40. Ahuja, K., and Singh, S. Biosurfactants Market size by Products. Glob. Mark. Insight. 2020. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactants-market-report>
41. Kumar A., Singh S.K., Kant C., Verma H., Kumar D., Singh P.P., etc. Microbial Biosurfactant: A New Frontier for Sustainable Agriculture and Pharmaceutical Industries. *Antioxidants (Basel)*. 2021, 10(9): 1472. doi: 10.3390/antiox10091472

42. Сучасні дезінфікуючі засоби та їх застосування в медицині. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medplatforma.com.ua/article/413-qqq-16-suchasn-deznfkuyuch-zasobi-ta-h-zastosuvannya-v-meditzin>

43. Дезінфекційні заходи в закладах лікувально-профілактичних закладах. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lavernamarket.com.ua/ua/a49606-dezinfektsijni-zahodi-likuvalnoprofilaktichnih.html>

44. BASF. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.basf.com/ua/uk/who-we-are.html>

45. Dow Chemical Company. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://corporate.dow.com/en-us.html>

46. Procter & Gamble. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://us.pg.com/>

47. Unilever. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.unilever.com/>

48. Evonik Industries. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://corporate.evonik.com/en>

49. Львівська обласна інфекційна клінічна лікарня. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.guoz.lviv.ua/ukr/medychni0zaklady/201.html>

50. Дезінфікуючі засоби для обробки рук та поверхонь (Вінсепт 1л., Фамідез 5л., Клін Стрім 1л., Дезодерм 330мл. Хлорантоїн 1кг, Неодез екстра 1л.). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prozorro.gov.ua/tender/UA-2020-04-24-000754-b>

51. Державні санітарні норми та правила «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я», затверджені наказом Міністерства охорони здоров'я України від 11.08.2014 №552

52. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Білець І.В. Інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на суміші гексадекану та гліцерину. МІКРОБІОЛОГІЯ. 2012, 81(5): 611-619.

53. Pirog T.P., Konon A.D. Improvement of the technology for surfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Biotechnologia Acta*. 2015, 8(5): 27-38. doi:10.15407/biotech8.05.027

54. Сидоров Ю.І. Пілотні ферментери ємнісного типу. *Біотехнологія*. 2012, 5(2): 68-75

55. Bioengineering AG. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://bioengineering.su/o-kompanii.html>

56. Fermentation tank. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://chinapharmamachine.com/product/fermentation_tank

57. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проєкту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

58. Air filter AAF series. Compressed air filter. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.omega-air.si/products/compressed-air-filters/aaf-series-compressed-air-filters#prettyPhoto>

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

60. Borosilicate microglass fiber for particle and coalescence filtration. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.contec-filtration.com/air-andgasfiltration/filter-ingelements/fiberglass/coalescencefilters>

61. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика, затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 04.05.2020 р. N 1023

62. Інструкція із застосування засобу «Стериокс» («Sterioks») на промислових підприємствах з метою дезінфекції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/wp-content/uploads/2020/06/Instructions-Sterioks-202020.pdf>

63. Бактодез. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/baktodez/>

64. Методичні вказівки по використанню засобу Санітаб (Sanitab) з метою дезінфекції та достерилізаційного очищення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://med-line.com.ua/ua/instrukciya-sanitab>

65. Інструкція щодо застосування засобу «Фамідез® комбі» з метою дезінфекції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://famidez.ua/doc/2020%20MI%20Famidez%20Combi.pdf>

66. Методичні вказівки щодо застосування засобу мийного з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401» («Clean&Dez 401») з метою дезінфекції та достерилізаційного очищення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.mpi-dpr.com.ua/content/24-klindez-401-metodichni-vkazivki>

67. Методичні вказівки із застосування засобу "ДЕЗОлайт" з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://antiseptica.com.ua/downloads/dl/file/id/64/product/286/mu_dezolajt.pdf

68. Метод рекомендації до викон. кваліфік. роботи для здобуття освіт. ступ. «бакалавр» [Електронний ресурс]: для здобувачів вищої освіти спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології. фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. та заоч. форм навч./ уклад. Т.П. Пирог, В.О. Красінько, Ю.В. Карлаш. - К.: НУХТ, 2022. – 61 с.

69. Технології мікробного синтезу лікарських засобів [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курсової роботи для здобувачів освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч. / уклад.: Т.П. Пирог, В.О. Красінько, С.М. Тетеріна. – К.: НУХТ, 2020. – 55 с.

70. Дозатор рідини, води, молока, пива та інших напоїв за обсягом. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1493971053-dozator-zhidkosti-vody.html?>

71. Stülke J., Hillen, W. Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annual Review of Microbiology*. 2000, 54(1): 849–880. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.849

72. Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Mashchenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food and Bioproducts Processing*. 2015, 93: 11–18. doi:10.1016/j.fbp.2013.09.003

73. Kai M. Diversity and Distribution of Volatile Secondary Metabolites Throughout *Bacillus subtilis* Isolates. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11(559): 21. doi:10.3389/fmicb.2020.00559

74. FPZ Вихрові каналні повітродувки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bibus.ua/produkti-rishennja/povitroduvki-ta-aeraciine-obladnannja/vikhrovi-kanalni-povitroduvki/>

75. FPZ_catalogue_new_en.pdf. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.bibus.ua/fileadmin/product_data/fpz/documents/FPZ_catalogue_new_en.pdf

76. Турбокомпресори ID TURBO COMPRESSOR серії T2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-t2/>

77. Промислові осушувачі повітря Hankison рефрижераторного типу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/promyslovi-osushuvachi-povitrya-hankison-refryzheratornogo-typu/>

78. Повітрязбірник – ресивер повітряний РВ 2000. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rezervuary.com/ua/p1250235107-vozdushosbornik-resiver-vozdushnyj.html>

79. Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000х500-2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2>

80. Лабораторний реактор з зовнішнім контуром. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://techmachine.com.ua/ua/p1166888106-laboratornyj-reaktor-vstroennym.html>

81. Мембранні дозувальні насоси Seko Spring MS. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doznasos.com.ua/uk/katalog-produkcii/nasosy-dozatory-2/membranniy-nasos-dozator/seko-spring-ms-2/>

82. CATALOG-Bioreactor-System-Innova. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>

83. SS316 industrial polymerization reactor stainless steel chemical reactor tank. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/SS316-industrial-polymerization-reactor-stainless-steel_62008976760.html

84. Pilot SIP steel fermenter LB-16SFM. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.labotronics.com/steel-fermenters/lb-16sfm>

85. Дозатор ваговий F-500 (для гранул та порошків). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://packhouse.com.ua/ua/p1107239569-dozator-vesovoj-500.html>

86. Апарати сталіні емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php

87. Double-wall Glass Reactor SPEC. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.munroscientific.co.uk/Media/Doc/REAC-3L_SPEC.pdf

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

89. Красінко В.О., Белемець Т.О. Біологія клітин [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання К.: НУХТ, 2018. – 110 с.

90. Encyclopedia, Regnum prokaryotae [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tgw1916.net/Acinetobacter/calcoaceticus.html>

91. Lu Z, Guo W, Liu C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2018, 80(3): 427-433. doi:10.1292/jvms.16-0572

92. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis#:~:text=Bacillus%20subtilis%2C%20known%20also%20as,ruminants%2C%20humans%20and%20marine%20sponges.

93. *Bacillus subtilis* (сінна паличка): біохімічні властивості, вирощування і застосування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bigbro.com.ua/batsillyus-subtilis-bacillus-subtilis-sinna-palichka-biohimichni-vlastivosti-viroshhuvannya-i-zastosuvannya/>

94. Wikiwand. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.wikiwand.com/uk/Bacillus>

95. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.

96. Lopar M, Spoljaric IV, Cepanec N, Koller M, Braunegg G, Horvat P. Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM 545 growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2014, 41(6): 913-930. doi: 10.1007/s10295-014-1439-y
97. Huggett A.S.G., Nixon, D.A. Use of glucose oxidase, peroxidase, and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *The Lancet*. 1957, 270(6991): 368-370. doi:10.1016/s0140-6736(57)92595-3
98. Frank E.A., Shubha M.C., D'Souza C.J.M. Blood glucose determination: plasma or serum? *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2012, 26(5): 317-320. doi:10.1002/jcla.21524
99. Beale R.N., Croft D. A sensitive method for the colorimetric determination of urea. *Journal of Clinical Pathology*. 1961, 14(4): 418-424. doi:10.1136/jcp.14.4.418
100. Yang H., He O., Hu C. Feasibility of biodiesel production and CO₂ emission reduction by *Monoraphidium dybowskii* LB50 under semi-continuous culture with open raceway ponds in the desert area. *Biotechnology for Biofuels*. 2018; 11: 82. doi:10.1186/s13068-018-1068-1
101. Програма переддипломної практики для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання [Електронний ресурс] / уклад.: В.О. Красінько, Ю.М. Резніченко, – К.: НУХТ, 2022. – 22 с.
102. Anijiofor Sandra C., Nor Azreen Mohd Jamil, Sarah Jabbar, Sakyat Saad & Gomes Chandima. Aerobic and Anaerobic Sewage Biodegradable Processes: The Gap Analysis. *International Journal of Research in Environmental Science*. 2017, 3(3): 9-19. doi: 10.20431/2454-9444.0303002.
103. Красінько В.О. Природоохоронні біотехнології [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв. – проф. прогр. «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. - К.: НУХТ, 2020. – 218 с.

104. Kuśnierz M., Domańska M., Hamal K., Pera A. Application of Integrated Fixed-Film Activated Sludge in a Conventional Wastewater Treatment Plant. *Int J Environ Res Public Health*. 2022, 19(10): 5985. doi: 10.3390/ijerph19105985.
105. Disposal of Liquid Wastes and Disposal of Gaseous Wastes. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.biologydiscussion.com/difference/disposal-of-liquid-wastes-and-disposal-of-gaseous-wastes/7078>
106. Legg R. Air Filters. *Air Conditioning System Design*. 2017, 12: 213–223. doi:10.1016/b978-0-08-101123-2.00012-1

ДОДАТКИ

Додаток 1

Особливості одержання ПАР у *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241

БІОТЕХНОЛОГІЇ

Як тест-культури під час визначення антимікробної активності ПАР використовували штами бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Enterobacter cloacae* С-8) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2) з колекції живих культур кафедри біотехнологій і мікробіології Національного університету харчових технологій. Вирощування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснювали в рідкому середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35, NaCl — 1,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 0,6, KH_2PO_4 — 0,14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, вода дистильована — до 1 л, рН 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5% (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1% (об'ємна частка), що містив (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; H_3BO_3 — 0,006; KI — 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) — 0,5. Як джерела вуглецю використовували (% об'ємна частка): очищений гліцерин — 3, відходи виробництва біодизелю — 5, концентрації гліцерину різної якості еквімолярні за вуглецем.

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену в середовищі наведеного складу з 0,5% відповідного субстрату. Інокулянт, в якому чисельність бактерій становила 10^4 — 10^5 кл/мл, вносили у кількості 10% від об'єму середовища.

Як біологічний індуктор використовували бактеріальний штам *Bacillus subtilis* БТ-2 у вигляді суспензії живих та інактивованих клітин, а також у вигляді супернатанту. Внесення індуктора здійснювали на початку процесу культивування *Bacillus subtilis* БТ-2, вирощений на МПА упродовж 24 год, суспендували в 100 мл стерильної водопровідної води і вносили 2,5 мл суспензії на 100 мл середовища культивування продуцента ПАР. Інактивовані клітини (стерилізацією в автоклаві при 131°C упродовж 1 год) вносили з розрахунку 10 мл суспензії на 100 мл поживного середовища. Супернатант вносили з розрахунку 2,5 мл на 100 мл середовища культивування продуцента поверхнево-активних речовин.

Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності супернатанту, живих і інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 і без індукторів здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 7 діб.

Таблиця 1. Вплив біологічних індукторів на утворення поверхнево-активних речовин під час вирощування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю

Субстрат для синтезу ПАР	Біологічний індуктор	ПАР, г/л
Очищений гліцерин (3%, об'ємна частка)	Контроль (без індуктора)	1,42±0,07
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,96±0,04
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,54±0,07
	Супернатант	1,44±0,07
Відходи виробництва біодизелю (5%, об'ємна частка)	Контроль (без індуктора)	2,52±0,12
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	3,56±0,17
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,32±0,11
	Супернатант	2,36±0,11

Особливості одержання ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A

2.3 | Inoculum preparation

The *Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A strain was cultured in a 50-ml nutrient salt medium, with 0.02 v/v (2 vol.%) *n*-hexadecane as the carbon source in a 250-ml sterilized Erlenmeyer flask. After that, a loopful of bacteria colony from the agar plate was transferred to the media. The nutrient salt medium was composed of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; NaCl, 15 g/L; KCl, 1 g/L; KH_2PO_4 , 3 g/L; Na_2HPO_4 , 1.2 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g/L; MgSO_4 , 0.2 g/L; and yeast extract, 0.5 g/L. A 0.5-ml element solution containing ZnSO_4 , 0.29 g/L; CaCl_2 , 0.1 g/L; CuSO_4 , 0.25 g/L; MnSO_4 , 0.4 g/L was added to 1 L of the nutrient salt medium. The cultures were grown at 30°C and 200 rpm in the Innova 43 incubator shaker for 48 h.

responses.

The selected independent process variables for this study were the concentration of carbon source (refined waste cooking oil), the nitrogen source $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sodium chloride, pH, and temperature, at five levels, with six replicates at the central points. The response variable was the EI. The levels of the design variables are stated in Table 2. For the pH adjustment, 1 mol/L NaOH and 1 mol/L HCl were used.

Experiments were randomized to overcome any possible biases. All experiments were performed in duplicate. A flask without inoculum was used as the negative control.

To produce cell-free supernatant (crude biosurfactant), the culture broth was centrifuged at 10 000 rpm for 15 min and then passed through a 0.45- μm pore size filter paper. EI, ST, concentration of the biosurfactant, and critical micelle concentration

TABLE 3 Effect of different carbon sources on biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*; results represent the average of independent experiments $\pm$ standard deviation

Carbon source	Refined waste cooking oil	Waste cooking oil	Crude glycerol	Pure glycerol	<i>n</i> -hexadecane	Diesel	Ethanol
EI (%)	59.3 $\pm$ 2.56	57.9 $\pm$ 3.13	40.1 $\pm$ 4.22	54.7 $\pm$ 1.52	60.1 $\pm$ 2.63	58.7 $\pm$ 1.55	53.4 $\pm$ 3.26
ST (mN/m)	37.5 $\pm$ 0.33	38.4 $\pm$ 0.56	49.5 $\pm$ 0.61	44.7 $\pm$ 0.44	36.6 $\pm$ 0.42	38.1 $\pm$ 0.56	42.1 $\pm$ 0.6

Abbreviations: EI, emulsification index; ST, surface tension.

Table 3 indicates that, among the waste streams, the crude glycerol was not a feasible source for biosurfactant generation. The refined waste cooking oil led to slightly higher EI and lower ST than the unrefined waste cooking oil and the refined oil is lower in contaminants that could impact longer term effectiveness. The EI for the refined waste cooking oil was between the values obtained with some commercial sources of carbon (*n*-hexadecane and diesel) and higher than the value for ethanol. The ST values also showed that the refined waste cooking oil was the best waste stream studied and was comparable with the commercial sources. The refined waste cooking oil was then selected for further evaluation of the impacts of fermentation conditions on biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A.

3.3 | RSM results

Significant model terms are A (carbon), B (nitrogen), D (pH), E (temperature), A^2 , B^2 , C^2 , D^2 , and E^2 which express nonlinearities between the response and independent variables. The C (NaCl) should be in the model as C^2 is significant. The main significant model terms are D and D^2 (indicating a non-linear response on the surfactant production when pH changes). The model does not indicate any interaction between factors. The final equation in terms of coded factors is follows:

$$\begin{aligned} \text{EI} = & +62.85 - 2.00 \times A + 3.02 \times B - 1.15 \times C + 6.51 \times D \\ & + 3.5 \times E - 3.06 \times A^2 - 1.99 \times B^2 - 1.93 \times C^2 - 4.51 \\ & \times D^2 - 2.3 \times E^2 \end{aligned} \quad (2)$$

of 45.5% and 64% from a study using *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 and glucose as a carbon source,^[7] and a study where the EI was 58.33% using *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 and *n*-heptadecane as the

carbon source.^[4] At the optimized conditions, the ST was 32.4 mN/m, the concentration of the biosurfactant was 862 mg/L, and the CMC was 156 mg/L. This ST is less than 38.4 mN/m using glucose as the source of carbon using *Acinetobacter calcoaceticus* BU03.^[7] It is also

Особливості одержання ПАР *Bacillus subtilis* #309

* Correspondence: tomasz.janek@upwr.edu.pl; Tel.: +48-71-320-7734

Abstract: Most biosurfactants are obtained using costly culture media and purification processes, which limits their wider industrial use. Sustainability of their production processes can be achieved, in part, by using cheap substrates found among agricultural and food wastes or byproducts. In the present study, crude glycerol, a raw material obtained from several industrial processes, was evaluated as a potential low-cost carbon source to reduce the costs of surfactin production by *Bacillus subtilis* #309. The culture medium containing soap-derived waste glycerol led to the best surfactin production, reaching about 2.8 g/L. To the best of our knowledge, this is the first report describing surfactin production by *B. subtilis* using stearin and soap wastes as carbon sources. A complete chemical characterization of surfactin analogs produced from the different waste glycerol samples was performed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Furthermore, the surfactin produced in the study exhibited good stability in a wide range of pH, salinity and temperatures, suggesting its potential for several applications in biotechnology.

Keywords: *Bacillus subtilis*; biosurfactant; surfactin; lipopeptides; industrial wastes; crude glycerol

3.2. Microorganism

The previously reported bacterial strain *B. subtilis* #309, isolated from a crude oil sample from a Brazilian oil field [58], was used in all experiments. For long-term preservation, the strain was stored in 20% glycerol (*v/v*), at -80°C , in the Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland.

3.3. Culture Conditions

The modified MSM reported by Pereira et al. [21] was used for biosurfactant production by *B. subtilis* #309. The MSM consisted of (g/L): NH_4NO_3 4.0, Na_2HPO_4 5.0, KH_2PO_4

2.0, and $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2. Pure glycerol (POCH, Poland) or crude glycerol from different sources was added as a carbon source to the MSM at a concentration of 20 or 40 g/L, which corresponded to C/N ratios of 5.5 and 11, respectively. All culture media were adjusted to pH 7.0. Cultures were performed in 100 mL shake flasks containing 30 mL of MSM and incubated at 37°C and 160 rpm in a rotary shaker (Innova 44, New Brunswick Scientific, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 96 h. Each flask was inoculated with 1% of a pre-culture of *B. subtilis* #309 grown under the same conditions. Samples were taken regularly from the individual flasks and centrifuged at $4500 \times g$. The biomass concentration was determined gravimetrically after drying the cells at 105°C . The cell-free supernatants were used to measure the ST and glycerol consumption. The concentration of glycerol was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC, UltiMate 3000, Dionex-Thermo Fisher Scientific, London, UK) equipped with a HyperRez Carbohydrate H⁺ Column (Thermo Fisher Scientific, London, UK) and a refractive index (RI) detector (Shodex, Oigimachi, Japan). Experiments were conducted in three independent experiments performed in triplicate.

Особливості одержання ПАР *Bacillus subtilis* ATCC 6633

production of biosurfactants is a great challenge in biotechnological processes in the present economy. The success of its production depends on the development of an industrial bioprocess based on low cost raw materials, which may not exceed 10 to 30% of the cost of the final product (Cameotra and Makkar 1998). Thus, the use of a co-product from the biodiesel production (glycerol) as a carbon source could be a good alternative for the synthesis of biosurfactants by fermentation, since glycerol has a low market value due to the presence of various impurities in it (Thompson et al. 2006). Furthermore, the expansion of biodiesel production has made the price of glycerol to fall gradually, which may help to reduce the cost of biosurfactants production. The purpose of the present work was to use the glycerol obtained from the biodiesel production process as the main carbon source for biosurfactant synthesis by *Bacillus subtilis* ATCC 6633, with the goal of lowering the production costs associated with surfactin production. This strain has been reported for the production of biosurfactants from different carbon sources (Reis et al. 2004).

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

B. subtilis ATCC6633, obtained from André Tosello Tropical Foundation – Campinas, SP, Brazil, was maintained on APGE medium, consisting of (g/L) 5.0 peptone, 5.0 glucose, 2.5 yeast extract and 15.0 agar at 4°C and subcultured monthly.

Raw material

Glycerol used in this work resulted from the transesterification of soybean oil by methanol in alkaline medium (NaOH). Pre-treated glycerol (neutralized with H₂SO₄ and methanol evaporated) was provided by Empresa Brasileira

biosurfactant that resulted in an absorbance of 1.0 at 540nm (A_{540}) under the conditions described above.

Biomass

Cell growth was determined by measuring the optical density of samples, using a UV-visible spectrophotometer (20 Genesis, BR) at 600 nm. Cell concentration was determined using a calibration curve that related the values of optical density and dry weight (Makkar and Cameotra 1998).

Surfactin concentration

Surfactin concentration was determined using a Waters high-performance-liquid chromatographer equipped with a UV detector (Model 2487, Waters), at 205 nm, and a Symmetry C₁₈ column (150 x 4.6 mm, 5 µm, Waters, Ireland). The mobile phase consisted of 20% (v/v) trifluoroacetic acid (3.8 mM) and 80% (v/v)

glucose, 2.5 yeast extract, sterilized at 121°C for 15 minutes in the autoclave. The flasks were incubated in a rotary shaker (Tecnal – TE240, São Paulo, Brazil) at 180 rpm and 30°C for 24 h. Afterwards, the optical density (OD) of this culture was adjusted to 0.1–0.2 at 600 nm.

Culture medium

A defined mineral medium was firstly prepared according to Sar and Rosemberg (1983) with the following composition (g/L): K₂HPO₄ 13.99, KH₂PO₄ 6.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, (NH₄)₂SO₄ 4.0, and 0.04% yeast extract. The mineral medium was sterilized at 110°C for 10 minutes. Then 0.1% (v/v) of a micronutrient solution, consisting of (g/L) EDTA 2.5g, ZnSO₄·7H₂O 10.95, FeSO₄·7H₂O 5.0, MnSO₄·H₂O 1.54, CuSO₄·5H₂O 0.392, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.25 and Na₂B₄O₇·10H₂O 0.177, previously sterilized by filtration was added (Morán et al. 2000). Finally, 2% (v / v) of glycerol, previously sterilized at 121 °C for 15 min, was added to the medium.

Batch fermentation

All the assays were conducted in Erlenmeyer flasks of 250 mL with 50 mL of culture medium on a rotary shaker (TE240 - Tecnal, São Paulo, Brazil) at 180 rpm and 30°C. The medium was inoculated (1%, v/v) and incubated for 72h in isothermal conditions. Samples (50 mL) were collected at pre-defined intervals of time and analysed for biomass, substrate and surfactin concentrations, emulsification index (E_{24}), surface tension and critical micelle concentration (CMC).

Analytical methods

Emulsification index (E_{24})

Emulsification index was determined according to Cooper and Goldenberg (1987), with slight modifications: 2.0 mL of cell-free supernatant was added to 2.0 mL of different hydrophobic sources (soy oil, kerosene, N-hexadecane) and the mixture was homogenized in a vortex-type stirrer for 2

RESULTS AND DISCUSSION

Biosurfactant production by *B. subtilis* ATCC6633 cultivated in mineral media supplemented with Glycerol.

The effect of a semi-defined medium, mineral medium using glycerol as carbon source on surfactin production by *B. subtilis* ATCC6633 was examined in this work by monitoring the changes in cell growth, glycerol consumption and surfactin concentration. The results as shown in Figure 1 revealed that the strain was able grow and to produce surfactin from glycerol. After 48 h of cultivation, there was an increased in the production of surfactin, reaching a concentration of 158.14 mg/L at 72 h of fermentation. At the same time, an increase in cell concentration was observed, reaching 1.69 g/L, with a glycerol conversion of 97%.

Особливості одержання ПАР *Pseudomonas aeruginosa* WAE

Walaa A. Eraqi,¹ Aymen S. Yassin,¹ Amal E. Ali,^{1,2} and Magdy A. Amin¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Cairo 11562, Egypt

²Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Pharmaceutical Industries, Future University, Cairo 11787, Egypt

Correspondence should be addressed to Aymen S. Yassin; aymen.yassin@pharma.cu.edu.eg

Received 2 November 2015; Revised 13 December 2015; Accepted 15 December 2015

Academic Editor: Manuel Canovas

Copyright © 2016 Walaa A. Eraqi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Biosurfactants are produced by bacteria or yeast utilizing different substrates as sugars, glycerol, or oils. They have important applications in the detergent, oil, and pharmaceutical industries. Glycerol is the product of biodiesel industry and the existing glycerol market cannot accommodate the excess amounts generated; consequently, new markets for refined glycerol need to be developed. The aim of present work is to optimize the production of microbial rhamnolipid using waste glycerol. We have developed a process for the production of rhamnolipid biosurfactants using glycerol as the sole carbon source by a local *Pseudomonas aeruginosa* isolate that was obtained from an extensive screening program. A factorial design was applied with the goal of optimizing the rhamnolipid production. The highest production yield was obtained after 2 days when cells were grown in minimal salt media at pH 6, containing 1% (v/v) glycerol and 2% (w/v) sodium nitrate as nitrogen source, at 37°C and at 180 rpm, and reached 2.164 g/L after 54 hours (0.04 g/L.h). Analysis of the produced rhamnolipids by TLC, HPLC, and FTIR confirmed the nature of the biosurfactant as monorhamnolipid. Glycerol can serve as a source for the production of rhamnolipid from microbial isolates providing a cheap and reliable substrate.

2.8. Characterization of Partially Purified Rhamnolipid

2.8.1. Thin Layer Chromatography. Previously purified rhamnolipids were dissolved in chloroform and 10 μ L was applied onto a TLC plate (silica gel 60, Sigma, USA) at a point of origin near the bottom of the plate. Once dried, the plate was developed in solvent system of chloroform : methanol : acetic acid (6.5:1.5:0.2, v/v/v) [22]. When developed, the plate was removed and allowed to air-dry and then it was evenly sprayed with anthrone reagent, prepared by mixing 63 mL of sulfuric acid, 25 mL of water, and 0.125 g of anthrone under ice conditions, and placed in an oven at 110°C for 20 min. Upon visualization, the spot nearer the point of origin corresponded to the dirhamnolipids, while the spot further from the point of origin represented the monorhamnolipids.

2.8.2. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrophotometer. The partially purified pellet was dissolved in water and the IR spectra were recorded on a FTIR spectrometer in the 4000–400 cm^{-1} spectral region at a resolution of 2 cm^{-1} . Comparison was made to standard rhamnolipid R-95 (Sigma, USA).

2.8.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

3.2. Examining the Role of Different Carbon Source. The production of rhamnolipid by *P. aeruginosa* WAE was compared using glucose or glycerol as the sole carbon source. The produced concentration of rhamnolipid was 1700 mg/L and 1400 mg/L when using glucose or glycerol, respectively, indicating that glycerol can provide the fermentation medium with an adequate carbon source (Figure 1).

3.3. Optimization of Rhamnolipid Production from Glycerol by *P. aeruginosa* WAE

3.3.1. Effect of Glycerol Concentration. The effect of different glycerol concentration (0.5%, 1%, 2%, 3%, and 4%) on rhamnolipid production was evaluated; fermentation was done in MSM supplemented with 2% NaNO_3 , pH 7, 180 rpm, and 37°C. The results show that the highest levels of rhamnolipids (1350–1400 mg/L) were achieved when using 0.5% or 1% glycerol after approximately 48 hours. Raising the concentration of glycerol to 2%–3% led to a slight increase in the yield up to 1450 mg/L but after 96 hours. Additional increase in glycerol concentration had an inhibitory effect as the production of rhamnolipid diminished.

Особливості одержання ПАВ *Pseudomonas aeruginosa* JBK1

The present investigation demonstrates the utilization of biodiesel-derived crude glycerol as a low-cost substrate for the production of biosurfactant. *Pseudomonas aeruginosa* JBK1 was identified using 16S rRNA sequencing. A maximum of 3.9 g biosurfactant was obtained at 3% raw bio-glycerol having the critical micelle concentration (CMC) at nearly 540 mg l⁻¹. The bacterium lowered the surface tension (ST) of culture medium up to 33.7 mN m⁻¹ within 60 h of fermentation and showed better adhesion to the hydrophobic substrate surfaces. The biosurfactant formed stable emulsion with various hydrocarbons and achieved a maximum emulsion index of 62% with kerosene and xylene. The cell free

[View Article Online](#)
RSC Advances

Paper

microbial growth and biosurfactant production have been suggested towards making their production economically viable.^{10,11} The selection of cost-effective culture media components which constitute 50% of the total production cost is the key bottleneck in the production of biosurfactant.^{11–13} The rapid progress in the biodiesel production technology has led to the generation of tremendous quantities of glycerol wastes, as the main by-product of the process.¹⁴ Stoichiometrically, it has been estimated that 10 kg of glycerol wastes are produced for every 100 kg of biodiesel.¹⁵ On the basis of the technology used for the production of biodiesel, glycerol wastes may contain various types of impurities such as methanol, salts, soaps, heavy metals, and residual fatty acids.¹⁶ Due to the presence of such heavy impurities, further purification of the biodiesel-derived glycerol for its industrial applications is reported to be unprofitable.^{15,17} Therefore, the utilization of waste glycerol through biotechnological approaches represents a promising alternative for the effective management of such kind of industrial wastes.¹⁴ Thus, use of such inexpensive by-products will be more economic for the production of biosurfactant having commercial value with waste minimization. The objective of this work was to assess the potentiality of biodiesel-derived waste crude glycerol for the production of biosurfactant by the indigenous bacterium and application of such biosurfactant in the bioremediation processes.

result were taken for phylogenetic analysis and nucleotide frequency count analysis using CLC Main work bench.

2.4 Culture medium and fermentation conditions

The waste glycerol produced during converting *Jatropha* seed oil to biodiesel was collected from Department of Energy, Tezpur University, Assam. The pH of the waste product was adjusted to 7.0 by adding 5 N NaOH. The glycerol fraction from the neutralized waste product was separated by using a glass separating funnel and dried at 50 °C in an oven to remove the residual moisture. For the fermentation, 100 ml of sterile mineral salt medium (MSM) in 250 ml Erlenmeyer flask was inoculated with 1%, of 16 h old inoculum culture and was incubated at 37 °C in an orbital incubator shaker at 180 rpm for 11 days.² The mineral salt medium was used for the fermentation process and supplemented with 3% (v/v) waste raw glycerol. All samples were withdrawn at regular interval from the culture broth to monitor the cell growth (g l⁻¹) using determining the OD at 600 nm,¹² biosurfactant concentration (g l⁻¹) using determination of rhamnose content by orcinol assay and reduction in the surface tension (mN m⁻¹) using du Noüy ring method.²

2.5 Biosurfactant recovery and purification

The culture broth was centrifuged at 12 000 rpm for 20 min at

[View Article Online](#)
RSC Advances

Paper

non-shiny surface when grown on nutrient agar plates. The bacterial strain produces yellow colored pigments when cultivated in *Pseudomonas* isolation agar medium. Scanning electron microscopic study shows that the bacterial strain is rod shaped with smooth surface (shown in ESI Fig. S1†). Biochemical and physiological experiments revealed that the bacterial strain is aerobic, motile, non-spore forming, gram negative and able to grow between 30 and 40 °C temperature. Based on the results of above experiments, the bacterial strain was identified as *Pseudomonas* sp. The 16S rRNA gene sequencing as well as BLAST search revealed that the bacterial strain is closely related to the species of *Pseudomonas aeruginosa* with 99% similarity (ESI Table S1†). The sequence was deposited to the NCBI GenBank Database and assign the accession number JX843422. The BLAST result of *Pseudomonas aeruginosa* strain JBK1 showed maximum similarity with 13 different strains of *Pseudomonas*

24 h of incubation indicating the suitability of the biodiesel-derived crude glycerol as the carbon substrate. At the end of 132 h of fermentation, a maximum of 1.9 g l⁻¹ of biomass was reached. The bacterial strain began to produce biosurfactant significantly after 12 h of incubation and reached a yield of 3.9 g l⁻¹ of biosurfactant at the end of 132 h. With the production of biosurfactant, the surface tension of the culture medium started reducing after 24 h of incubation indicating the accumulation of biosurfactant at the interfaces. Results indicated that the production of biosurfactant by the bacterium occurred during the exponential phase of growth suggesting the production of biosurfactant as a primary metabolite along with the formation of cellular biomass.^{12,26,27}

3.4 Chemical characterization

Метод визначення концентрації біомаси

біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка;

визначення показників інтенсивності метаболізму, безпосередньо пов'язаних з ростом (поглинання кисню, утворення CO_2).

(СА), залити 5 мл стерильного фізіологічного розчину (або стерильної водопровідної води), суспендувати клітини (змити культуру за допомогою стерильної піпетки чи петлі), суспензію перенести в стерильну пробірку.

4. Засів приготовлених поживних середовищ. Визначити оптичну густину клітинної суспензії посівного матеріалу (за необхідності розбавити дистильованою водою у 10 разів) – ФЕК, 540 нм, довжина світлового шляху 5 мм. Кількість посівного матеріалу становить залежно від варіанту (див. табл. 4.3) 1 та 5 % (об'ємна частка). Після посіву визначити початкову оптичну густину суспензії.

Метод визначення концентрації ПАР

колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 7 діб.

Кількість позаклітинних ПАР визначали, використовуючи модифікований метод Блая і Дасра (Bligh & Dyer, 1959) після екстракції їх сумішшю хлороформу і метанолу (2:1) з супернатанту культуральної рідини. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 г упродовж 20 хв.

Оскільки *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів, а відомий метод Блая і Дасра, використовуваний для виділення ПАР, дає змогу виділяти в основному неполярні ліпіди, ми модифікували класичну систему розчинників (суміш Фолча) додаванням до неї 1 М HCl (хлороформ–метанол–вода = 4:3:2). Така система дає змогу максимально повно виділяти як полярні, так і неполярні ліпіди.

У циліндричну ділильну лійку об'ємом 100 мл поміщали 25 мл супернатанту, додавали 1 н розчин HCl для досягнення pH 4,0—4,5 (близько 5 мл), воронку закривали шліфованою пробкою і струшували 3 хв, потім додавали 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшували (екстрагування ліпідів) протягом 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали в ділильній воронці для

BIOTECHNOLOGIES

поділу фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 1 н розчин HCl для досягнення pH 4,0—4,5 (близько 5 мл), 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) й екстрагували ліпіди протягом 5 хв. Після поділу фаз зливали нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 об'єднували й упарювали на роторному випарнику IP-1M2 при 50°C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

У дослідженнях як препарати використовували розчини поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 різної концентрації. Для цього сухий залишок ПАР розчиняли в стерильному фосфатному буфері (0,1 М, pH 7,0) до вихідного об'єму (25 мл) і далі розводили цим буфером до необхідної концентрації. Розчини ПАР стерилізували в автоклаві при 112°C впродовж 30 хв.

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) (Chebbi та ін., 2017). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. У стерильних

Метод ВЕРХ для гліцерину

Analytical procedures

Determination of cell dry mass (CDM)

A gravimetric method was used to determine the biomass concentration expressed as CDM in fermentation samples. Five milliliters of culture broth was centrifuged in pre-weighed glass screw-cap tubes for 10 min at 10 °C and 4,000 rpm in a Heraeus Megafuge 1.0 R refrigerated centrifuge. The supernatant was decanted and used for substrate analysis. The cell pellets were washed with distilled water, re-centrifuged, frozen, and lyophilized to a constant mass. CDM was determined as the mass difference between the tubes containing cell pellets and empty tubes. The determination was done in duplicate. The lyophilized pellets were subsequently used for determination of intracellular PHB as described below. Residual biomass (non-PHB part of biomass) was calculated by subtracting of PHB mass from CDM mass.

GC-FID analysis of PHB

PHB in lyophilized biomass samples was transesterified by acidic methanolysis according to Braunege's method [1]. Gas chromatographic analysis was performed with a 6850 Network GC System (Agilent Technologies), equipped with a 25 m × 0.32 mm × 0.52 μm HP5 capillary column and a flame ionization detector (FID). Helium (Linde; purity = 4.6) was used as a carrier gas with a split-ratio of 1:5, hydrogen (Linde; purity = 5.0) and synthetic air (Linde; purity = "free of hydrocarbons") as detector gases and nitrogen (Linde; purity = 5.0) as auxiliary gas.

The following protocol for the temperature program was used: Initial temperature: 50 °C; rate 1:15 °C/min; final temperature 1:60 °C; rate 2:2 °C/min; final temperature 2:80 °C; final temperature 3:300 °C; final time 3:5 min. The determination of all samples was done in duplicate. The methyl esters of PHB constituents were detected by a flame ionization detector (FID); carrier gas: helium (split-ratio of 1:10), injection volume of 1 μL. The co-polyester Poly(3HB-co-15.6 %-3HV) (BIOPOL, ICI, UK) was used as reference material and hexanoic acid acted as the internal standard. The PHB content (wt %) was defined as the percentage of PHB concentration to dry cell mass (CDM).

Ammonia determination

Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The measuring range of the test for ammonium is 6–193 mg/L. Ammonium sulphate was used as reference. Deionized water was used as zero reference.

Glycerol determination

Glycerol concentration in supernatant (remaining after the centrifugation step described in 2.2.1) was monitored using a high-performance liquid chromatography (HPLC; Shimadzu) equipment consisting of a thermostated Aminex HPX 87H column (thermostated at 75 °C, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a LC-20AD pump, a SIC-20 AC auto-sampler, a RID-10A refractive index detector, and a CTO-20 AC column oven. For registration and evaluation of the data, LC solution software was used. Sterile-filtrated supernatant was transferred into vials and water was used as eluent at a flow rate of 0.6 mL/min. External standards were prepared using different concentrations of p.a. glycerol.

Cultivation conditions

Inoculum preparation

Colonies from solid agar slants (2.1) were cultivated in small baffled shaking flasks (100 mL medium in 300-mL flasks) at 37 °C under continuous shaking in liquid minimal media containing glycerol as the sole carbon source. After sufficient growth of the strain was achieved, large baffled shaking flasks (1 L) containing fresh medium (250 mL) were inoculated with each 5 mL of the first liquid cultures. These large cultures were incubated overnight under continuous shaking at 37 °C and subsequently used as inoculum cultures for the bioreactor experiment.

Cultivation in bioreactor

The cultivation was carried out aerobically in a laboratory bioreactor (Labfors 3, Infors, CH, working volume 5 L; glass vessel stirred from the upper side) under controlled conditions for pH value (7.1 ± 0.1), temperature (37 °C), and dissolved oxygen concentration pO₂ (controlled by agitation speed of two axial stirrers and air flow rate; during growth phase, pO₂ amounted to 40 %, during the phase of predominant PHB-accumulation to 20 % of the oxygen saturation concentration). The sterilization of the reac-

Глюкозооксидазний метод визначення глюкози

cannot deduce that lipaemia has no effect on blood-flow in very narrow tubes such as capillaries and arterioles.

It also seems clear that heparin has no significant effect on blood viscosity in either the fasting or lipaemic subject. If heparin increases coronary flow volume, as reported by Gilbert and Nalefski (1949) and relieves effort angina as reported by Graham et al. (1951), these actions must depend on mechanisms other than lowering of blood viscosity.

The increase in viscosity, on standing, of the first post-heparin sample (VC_1) seems to be an in-vitro effect only. It is probably caused by a heparin-lipid-corpusele combination. Swank and Levy (1952) suggest that heparin facilitates the transport of neutral fat through the capillary wall. Whatever the mechanism, this heparin-lipid complex is "cleared" in vivo without causing profound changes in blood viscosity.

Summary

Lipemia has no effect on the viscosity of serum or plasma. Neither lipemia, nor the action of heparin in the fasting or lipaemic subject, has a significant effect on the viscosity of circulating blood.

Certain in-vitro changes in viscosity are noted and an explanation for them is suggested.

I wish to thank Dr. J. W. Chambers for laboratory facilities at Stobhill General Hospital.

REFERENCES

- Fahraeus, R., Lindqvist, T. (1931) *Amer. J. Physiol.* **96**, 562.
 Gilbert, N. C., Nalefski, L. A. (1949) *J. Lab. clin. Med.* **34**, 797.
 Graham, D. M., Lyon, T. F., Gofman, J. W., Jones, H. B., Yankley, A., Simonton, J., White, S. (1951) *Circulation*, **4**, 666.
 Langstroth, L. (1919) *J. exp. Med.* **30**, 597.
 Nygaard, K. K., Wilder, M., Berkson, J. (1935) *Amer. J. Physiol.* **114**, 128.
 Swank, R. L., Levy, S. W. (1952) *Ibid.* **171**, 208.
 Wintrobe, M. M. (1956) *Clinical Haematology*. London; p. 314.

USE OF GLUCOSE OXIDASE, PEROXIDASE, AND O-DIANISIDINE IN DETERMINATION OF BLOOD AND URINARY GLUCOSE

A. ST. G. HUGGETT

M.B., D.Sc., Ph.D. Lond.

PROFESSOR OF PHYSIOLOGY IN THE UNIVERSITY OF LONDON

D. A. NIXON

M.Sc. Lond.

LECTURER IN PHYSIOLOGY

From the Physiology Department, St. Mary's Hospital Medical School, London

It is well known that the estimation of blood-glucose by reducing methods lack specificity and give values which are too high. Enzymes, however, enable a greater selectivity of the reducing substances to be made.

In the presence of glucose oxidase, which is highly specific for glucose, glucose is oxidised to gluconic acid and hydrogen peroxide (Keilin and Hartree 1948). The hydrogen peroxide can, in the presence of peroxidase, oxidise a suitable oxygen acceptor to give chromogenic oxidation products (Keston 1956, Teller 1956), the intensity of whose colour is proportional to the amount of glucose initially present.

White and Secor (1957) have demonstrated glucose on paper chromatograms by adding glucose oxidase and detecting the resultant gluconic acid by an acid-iodide-iodate-starch

Method

Reagent

A mixed enzyme-oxygen acceptor reagent is prepared as follows:

Glucose oxidase 125 mg., peroxidase 0.5 mg., and 0.5 ml. of 1% o-dianisidine (in 95% ethanol) are taken and made up to 100 ml. with 0.5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (adjusted to pH 7) with NaOH) and filtered through paper. This preparation is called here the reagent.

The sources of the enzymes, when not prepared from *Penicillium notatum* (glucose oxidase) or horse-radish (peroxidase), is important.

Glucose-oxidase preparations are obtainable from the Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.; G. F. Boehringer and Soehne, G.M.B.H., Mannheim, Germany; and Takamine Chemical Company, New Jersey, U.S.A. The peroxidase is obtainable from Boehringer and from Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, U.S.A. A mixture of the two enzymes and oxygen acceptor is marketed in the U.S.A. under the proprietary name of 'Glucostat' by the Worthington Corporation, New Jersey, U.S.A. The work in this paper was done with the Sigma glucose oxidase and the Boehringer peroxidase.

The reagent may be stored in a brown glass bottle at -5°C with little loss of activity for about a week. It goes brownish owing to auto-oxidation of the o-dianisidine, but this colour is allowed for in the blank.

Anticoagulation and Inhibition of Glycolysis

Anticoagulation may be achieved either with heparin or with a mixture containing sodium fluoride 10 mg. and potassium oxalate 30 mg. per 10 ml. of blood (Baylis 1950). The latter method is used where the prevention of glycolysis in stored blood is desirable. A tenfold increase in the concentration of this mixture is still without any effect on the efficiency of the reagent.

Deproteinising

Concordant results can be achieved using zinc, barium, or cadmium hydroxides or ethanol as deproteinising reagents.

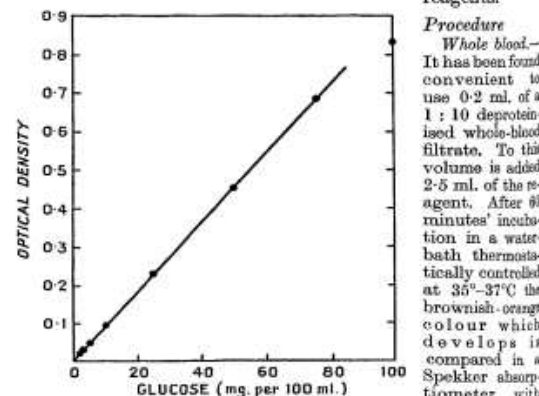


Fig. 1.—The linear development of colour with increasing glucose concentrations in 0.1 ml. of glucose solutions and 2.5 ml. of reagent (read in 0.5-cm. cell after 60 minutes' incubation at -35°C).

Procedure

Whole blood.—It has been found convenient to use 0.2 ml. of a 1:10 deproteinised whole-blood filtrate. To this volume is added 2.5 ml. of the reagent. After 60 minutes' incubation in a water-bath thermostatically controlled at $35^\circ\text{--}37^\circ\text{C}$ the brownish-orange colour which develops is compared in a Spekker absorptiometer with 601 filters or in a Hilger spectrophotometer at 420 mμ with the colours produced

Blood Glucose in Plasma and Serum 3

The blood was centrifuged at 2,500 rpm for 10 min and the clear plasma or serum was used in the assay. Blood sugar was estimated using the Beckton Dickinson blood sugar assay Kit (Beckton Dickinson India Pvt. Ltd., Bangalore, India). Plasma or serum (10 μl) was mixed with 90 μl of reagent consisting of glucose oxidase-peroxidase-O-dianisidine. After 10 min, Optical Density (OD) of the colored complex was measured at 620 nm in an autoanalyzer. Blood sugar in these samples stored at room temperature was measured again after

glucose that was different between the samples showed a normal distribution and was independent of the actual blood glucose values, this suggests that the decrease in blood glucose is not entirely proportional to the initial blood glucose level but may have other factors contributing to its overall decrease.

Although plasma is devoid of red blood cells (RBCs) and white blood cells (WBCs), they still contain platelets, and hence, the platelet glucose metabolism can affect the amount of glucose measured with time. On the other

Спектрофотометричний метод визначення сечовини

SYNOPSIS A method is described for the direct colorimetric determination of urea in biological fluids. The method depends on the reaction (first described by Wheatley, 1948) between urea, diacetylmonoxime, and phenylanthranilic acid in the presence of controlled amounts of oxidant; chloride ions are included to sensitize the reaction; manganous ions stabilize the resultant colour; and phosphate enables reasonable reproducibility to be achieved.

The method is rapid and suitable for routine analytical purposes. Precision and accuracy are good; sensitivity is high for an activated acid reagent up to about one week old, and thereafter decreases.

A hypothetical mechanism for colour formation is presented.

rich growth media containing half of the urea concentration. The algal culture was harvested every 3 or 4 days. The semi-continuous experiment was carried out in a 200 m² ORP for a month.

The water used for algal cultivation was pumped from the ground and contained 89.39 ppm Na⁺, 62.92 ppm SO₄²⁺, and low levels of K⁺ (1.69 ppm), Mg²⁺ (13.65 ppm), Ca²⁺ (12.66 ppm), Cl⁻ (24.12 ppm), and NO₃⁻ (1.41 ppm) [13].

Analytical procedures

Biomass measurement

Biomass productivity (BP, mg L⁻¹ day⁻¹) was calculated according to Eq. (1):

Determination of urea concentration

Urea concentration was determined following the protocol outlined by Beale and Croft [22]. The liquid sample collected from the raceway pond was filtered using a 0.22 µm-pore filter and then diluted 60-fold with deionized water for each sample. The sample was collected and mixed with 1 volume of diacetylmonoxime–phenylanthranilic acid reagent (1 volume of 1% w/v diacetylmonoxime in 0.02% acetic acid and 1 volume of phenylanthranilic acid in 20% v/v ethanol with 120 mM NaCO₃). Exactly, 1 mL of activated acid phosphate (1.3 M NaH₂PO₄, 10 mM MnCl₂, 0.4 mM NaNO₃, 0.2 M HCl in 31% v/v H₂SO₄) was added before incubation in boiling water for 15 min. The tubes were left to

cool, and their OD₅₂₀ were determined using a UV/Vis spectrophotometer.

Statistical analysis

The values were expressed as mean ± standard deviation. The data were analyzed by one-way ANOVA using SPSS

KEGG: Глюконеогенез *Acinetobacter calcoaceticus*Glycolysis / Gluconeogenesis - *Acinetobacter calcoaceticus*

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

Change pathway type

Option

Scale: 80%

Search

ID search

Color

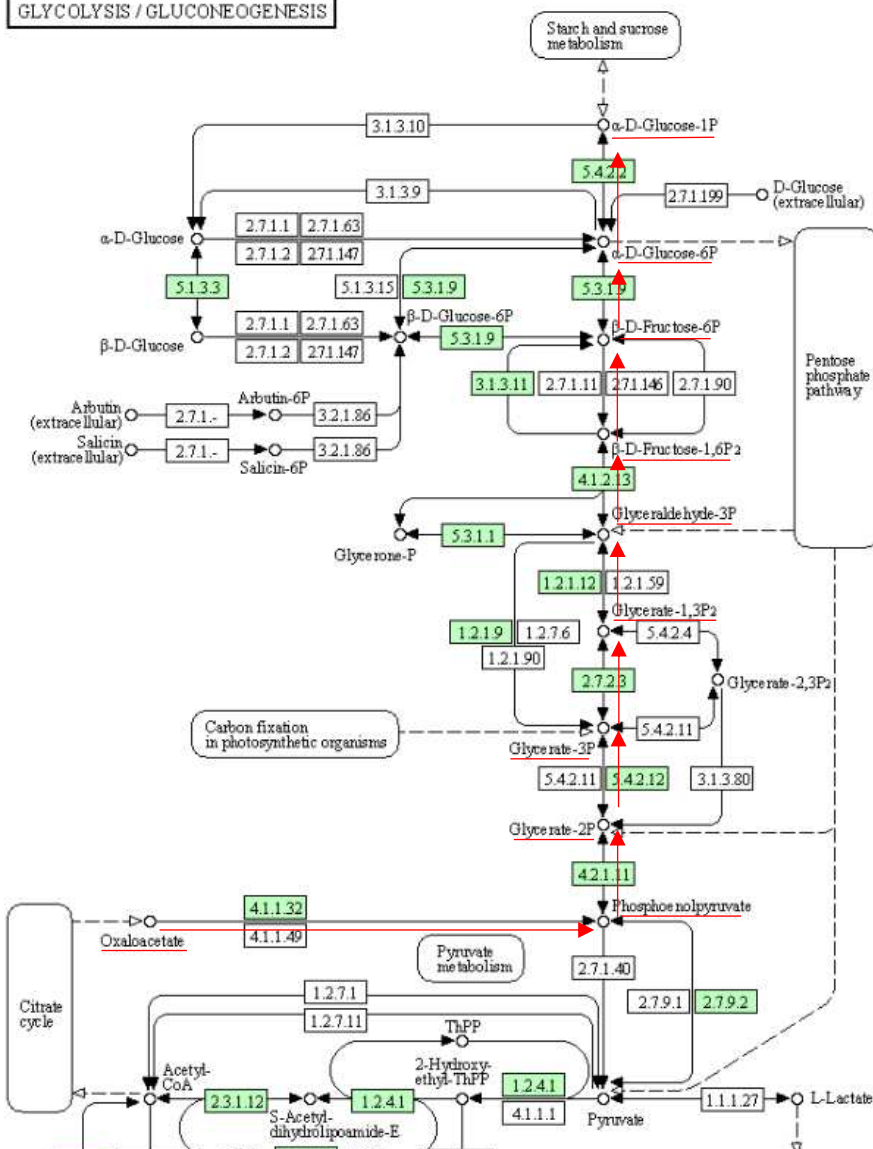
Module

Complete only

☐ **Pathway modules**

- ☐ Carbohydrate metabolism
 - ☐ Central carbohydrate metab
 - ☐ M00003 Gluconeogenesis
 - ☐ M00307 Pyruvate oxidatio

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS



KEGG: Цикл трикарбонових кислот *Acinetobacter calcoaceticus*Citrate cycle (TCA cycle) - *Acinetobacter calcoaceticus*
[Pathway menu](#) | [Pathway entry](#) | [Download KGML](#) | [Show description](#) | [Image file](#) | [Help](#)

Change pathway type

▼ Option

Scale: 100%

▼ Search

▼ ID search

▼ Color

▼ Module

Complete only

☐ Pathway modules

☐ Carbohydrate metabolism

☐ Central carbohydrate metab

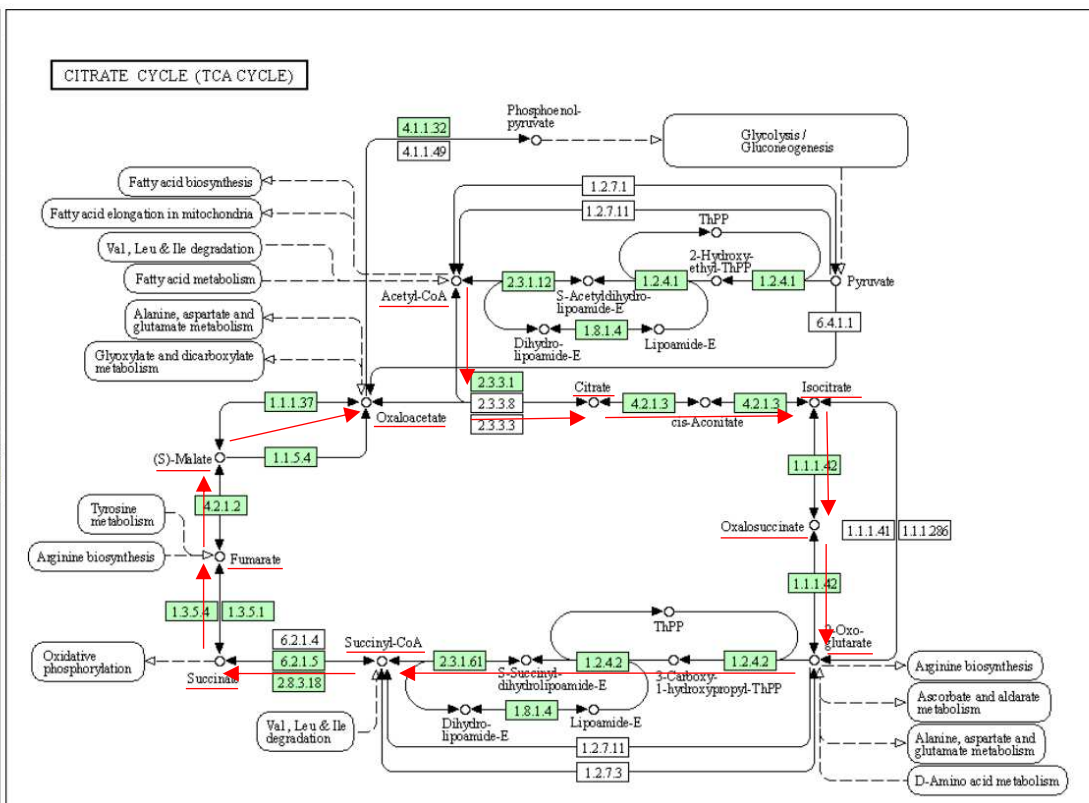
☐ M00003 Gluconeogenesis

☐ M00307 Pyruvate oxidatio

☐ M00009 Citrate cycle (TCA

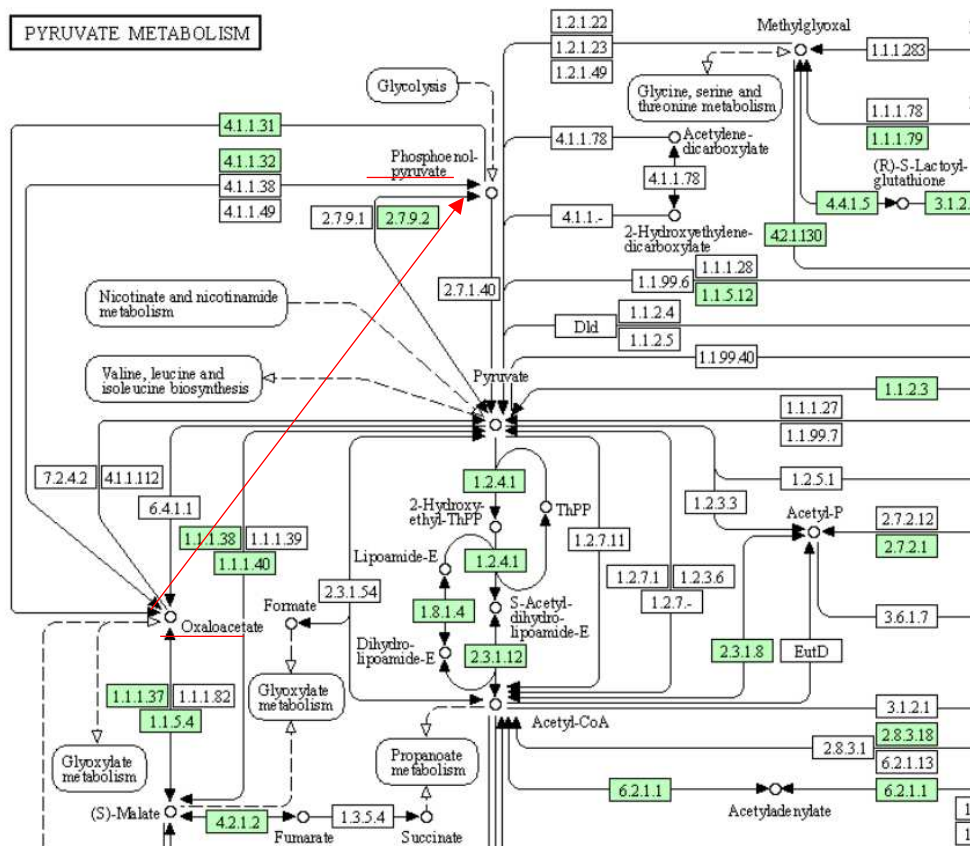
☐ M00010 Citrate cycle, first

☐ M00011 Citrate cycle, seco



KEGG: ФЕП-карбоксилазна реакція *Acinetobacter calcoaceticus*





Активність ферментів: ізоцитратліази та ФЕП-карбоксилази *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241

BIOTECHNOLOGIA ACTA, V. 8, No 5, 2015

Since the change in molar ratio of *n*-hexadecane and glycerol in the medium led to the change in the ratio of carbon/nitrogen, the next step was to investigate the synthesis of surfactant not only at the different molar ratio of monosubstrates in the medium, but at the constant value of C/N, equal to 30 (Table 2). Experiments have shown that under such cultivation conditions of IMV-B7241 strain the maximal values of surfactant synthesis was observed when the molar ratio of *n*-hexadecane/glycerol was 1:7.

To confirm the results about depending the synthesis of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants on the ratio of the substrate concentrations and C/N, it was studied the formation of surfactants during cultivation of bacteria on the mixture of *n*-hexadecane and glycerol (ratio 1: 7) in a broader range of C/N. In these experiments extracellular surfactant concentration (g/l) determining gravimetrically after extraction with organic solvents, was used as a criterion of the synthesis. It was established that 30 was the best ratio of carbon/nitrogen for the synthesis of surfactants. Under such conditions of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 cultivation the amount of synthesized surfactants was 350–265% from the concentration obtained on monosubstrate glycerol and *n*-hexadecane respectively.

The increased level of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 surfactant production on the mixture of *n*-hexadecane and glycerol is determined by the increase in the activities of enzymes responsible for the biosynthesis of surfactant glyco- (PEP-carboxykinase, PEP-synthetase) and aminolipids (NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase) and simultaneous functioning of two anaplerotic pathways (Table 3).

We have recently published the review [27] with literature data and results of our experimental studies concerning the use of

the mixture of substrates for intensification technology of microbial synthesis of the valuable products of fermentation, primary and secondary metabolites, including surfactants. It was reviewed in detail glycolipid and lipopeptide synthesis on the mixture of hydrocarbon substrates and vegetable oils, as well as the necessity of determining not only the ratio of monosubstrates in the mixture, but also their concentrations. For correct interpretation of results, the amount of carbon contained in the mixture and in monosubstrates should be taken into account.

In [29, 30], the authors empirically established the monosubstrate concentrations in the mixture as well as the choice of substrates, and used extremely high concentration (100–200 g/l), resulting in the low degree of conversion of the used substrates into surfactants (10–15%).

In our research to estimate monosubstrate combination, we used Babel's energy classification [7]. In the study it was used the mixture of energy-excessive *n*-hexadecane with energy-deficient ethanol, glucose and glycerol, and their concentration in the medium were low (3.0–16.8 g/l). To determine the molar ratio of the concentrations of monosubstrates in the mixture we performed theoretical calculations of the energy that is needed for surfactant and biomass synthesis on energy-deficient glycerol with subsequent determination of the concentration of energy-excessive *n*-hexadecane that replenishes the energy consumption of the process. According to calculated optimal molar ratio of *n*-hexadecane and glycerol 1: 7, the yield of the surfactants from the substrate was higher than it was described in the literature [29, 30].

Thus, the results presented in this paper showed the advisability of using of the

Table 3. Activities of the enzymes involved in anaplerotic pathways and surfactants biosynthesis in *A. calcoaceticus* IMV B-7241 grown on mono- and mixed substrates

The concentration of substrate, %	Activity, nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ of the protein				
	Isocitrate lyase	NADP ⁺ -dependent glutamate dehydrogenase	PEP-carboxylase	PEP-carboxy-kinase	PEP-synthetase
Glycerol 1.20 (control)	45 ± 2	322 ± 16	1608 ± 80	448 ± 22	2 894 ± 144
<i>n</i> -Hexadecane, 1.15 (control)	0	620 ± 31	2571 ± 129	667 ± 33	3 456 ± 172
<i>n</i> -Hexadecane, 0.5 + glycerol, 0.7	494 ± 24*	769 ± 38*	1 724 ± 86*	923 ± 46*	4 483 ± 224*

Note. * — $P \leq 0.05$ relative to control (activity of enzymes on monosubstrates). Mono- and mixed substrates are equimolar by carbon.

Характеристика мийно-дезінфікуючого засобу «Стериокс»

водню (20,0-25,0), оцтова кислота (18,0-30,0), стабілізуючі добавки, вода (до 100,0).

1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб являє собою концентровану прозору рідину від безбарвної до світло-жовтого кольору з характерним запахом оцтової кислоти. Добре змішується з водою у будь-якому співвідношенні. Водні розчини засобу прозорі, безбарвні, мають запах оцтової кислоти, інтенсивність якого залежить від концентрації розчину. Робочі розчини засобу в рекомендованих режимах застосування не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із нержавіючої сталі (у т.ч. хромистой хромонікелевої, аустенітної), луженого заліза, алюмінію, скла, гуми, кислотостійких пластмас (у т.ч. поліетилен, поліпропілен, полівінілхлорид), фторопласту (тефлон, вірон), гуми (у т.ч. силіконової), деревини, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям, з епоксидної смоли, емалі та гуми; припустима короткочасна обробка об'єктів з міді та її сплавів, оцинкованого заліза (можлива втрата кольору). Розчини засобу не піняться, видаляють механічні та залишкові білкові та жирові забруднення; не фіксують органічні забруднення, добре змиваються, не залишають нальоту. Робочі розчини засобу ефективні при температурі 4-50 °С, при підвищенні температури біоцидна активність розчинів зростає. Показник рН засобу < 1,0.

Засіб екологічно безпечний, розкладається на воду, кисень і оцтову кислоту.

1.5. Призначення засобу. Засіб «Стериокс» призначений для використання на підприємствах фармацевтичної, біотехнологічної, мікробіологічної, парфюмерно-косметичної, харчопереробної промисловості (у т.ч. м'ясо-, птичо-, молоко-, рибопереробної, пивобезалкогольної, консервної і плодоовочевої, виноробної, олійно-жирової промисловості); у виробництві соків, напоїв, фасованої мінеральної і питної води, напівфабрикатів, дитячого харчування, дріжджів, цукру, солоду, хлібопекарних і кондитерських виробів; на холодокомбінатах, холодильниках, складах та в інших виробництвах харчопереробної промисловості і агропромислового комплексу) з такою метою:

- для дезінфекції та санітарної обробки (миття і дезінфекції) поверхонь у виробничих, складських і санітарно-побутових приміщеннях, твердих меблів, технологічного обладнання (комунікацій, трубопроводів, резервуарів, смонтованих тощо), інвентарю, інструментів, тари виробничої і для фасування готової продукції, посуду, транспорту, санітарно-технічного обладнання, санітарного і спецодягу, прибирального матеріалу та ін.;

- для консервації арматури і деталей, які не використовуються (клапани, засувки, шланги тощо);
- для знезараження повітря виробничих приміщень;
- для знезараження «льодяної» води в системах охолодження;
- для деконтамінації тушок птиці і знезараження шкаралупи харчових яєць;

3.1. Засіб «Стериокс» використовують для дезінфекції і санітарної обробки технологічного обладнання, трубопроводів, комунікацій, резервуарів, апаратури, інвентарю, тари та поверхонь приміщень за режимами, зазначеними в таблицях 2-5. При дотриманні інструкції з використання засіб може бути використаний для обробки поверхонь з нержавіючої сталі, алюмінію, скла, полімерних матеріалів (зокрема, з тефлону, полістиролу, поліетилену, полікарбонату, поліуретану), оцинкованих, вкритих епоксидною смолою, гумою чи емаллю поверхонь.

Характеристика мийно-дезінфікуючого засобу «Бактодез (Bactodez)»

Концентрований дезінфікуючий засіб для одночасного миття та дезінфекції будь-яких поверхонь.

Властивості:

- робочі розчини мають виражені мийні, емульгуючі та дезодоруючі властивості;
- не викликають корозії металів, не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійких і нестійких до корозії металів, термостабільних та термолабільних матеріалів, скла, гуми, каучуку, штучної шкіри, полімерних матеріалів, латексу, вітону, тефлону, поліаміду, макролону, полістиролу, поліетилену, м'якого та твердого полівінілхлориду, плексигласу (акрилового скла), поліефіру, силікону, альгінату, гідроколоїду, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу;
- не пошкоджують поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, не залишають нальоту і плям на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці.

Сфера застосування

Дезінфекція у закладах охорони здоров'я усіх видів поверхонь (меблі, апаратура, устаткування), санітарно-технічного обладнання (умивальники, душові кабінети, піддони, ванни усіх типів (у тому числі акрилові), унітази, пісуари, кахлі, змішувачі, лійки та шланги для душу), кухонного приладдя (робочі поверхні, раковини, ємності, посуд, вітрини, кухонні прилади, плити, духові шафи, мікрохвильові печі, холодильне обладнання, витяжки), прибирального інвентарю при інфекціях бактеріальної, вірусної (включаючи гепатит А), грибкової (кандидози, дерматомікози) етіології; профілактична дезінфекція з одночасним миттям поверхонь та обладнання у пральнях, лабораторіях різних підпорядкувань, аптечних кіосках та складах, дитячих дошкільних закладах та

Характеристика мийно-дезінфікуючого засобу «Санітаб (Sanitab)»

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Повна назва засобу – засіб дезінфікуючий «Санітаб (Sanitab)»

1.2. Виробник – ТОВ «Бланідас» (Україна), за ТУ У 20.2-36423868-017:2015

1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин: трихлорізоціанурова кислота (ТХЦК) – 55,0 % (діюча речовина); ізоціанурова кислота – 10,0 %, бікарбонат натрію – 30,0 %, карбонат натрію – 5,0 %.

1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб випускається у вигляді таблеток білого кольору (допускаються відтінки та вкраплення) круглої форми, вагою $3,2 \pm 0,2$ г, які добре розчиняються у воді (протягом 2-3 хв.) або гранул. При розчиненні однієї таблетки або 0,5 мірної ложки гранул у воді виділяється $1,6 \pm 0,1$ г активного хлору. Робочі розчини засобу володіють антикорозійними, стабілізуючими властивостями, пом'якшують воду, мають змочувальні, емульгуючі, високі мийні та відбілюючі властивості, не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійно-стійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, силікону, пластмас, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів, апаратів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, не фіксують забруднення органічного походження на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці. Видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення, гомогенізують мокротиння та інші виділення. Засіб не горить, вибухобезпечний, сумісний з милами, сульфонованими маслами, аніонними поверхнево-активними речовинами, амфотерними та неіоногенними речовинами, солями лужних металів неорганічних і органічних кислот.

- для дезінфекції та одночасного миття поверхонь приміщень (підлога, стіни, двері, підвіконня, віконні рами), меблів, предметів обстановки, медичних приладів, апаратів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, предметів догляду хворих, лабораторного, столового, кухонного, аптечного посуду (у тому числі одноразового використання), місткостей для зберігання харчових продуктів, білизни, іграшок, санітарно-технічного обладнання, інвентарю для прибирання, сміттєзбиральних ємностей, гумових килимків, банних сандалів, шкіряного взуття, капців, стоків, зливів тощо;

- для знезараження перед утилізацією використаних виробів медичного призначення

Характеристика мийно-дезінфікуючого засобу «Фамідез® комбі»

ІНСТРУКЦІЯ

щодо застосування засобу "Фамідез® комбі" з метою дезінфекції

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Повна назва засобу – дезінфекційний засіб "Фамідез® комбі".

1.2. Фірма виробник - ТзОВ "ДезоМарк" (Україна).

1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: алкілдиметилбензиламонію хлорид –16,0; алкілпропілендіамін-1,5-біс-гуанідин ацетат – 9,2 (діючі речовини), неіоногенні ПАВ <10,0; органічний розчинник <10,0; запашка - ≤ 0,5; барвник ≤ 0,5; вода - до 100,0.

1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Прозора рідина голубого або зелено-голубого кольору (колір засобу залежить від кольору використаного барвника). Має помірний специфічний запах поверхнево-активних речовин.

Добре розчиняється у воді. Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту.

3.1.2. Дезінфекції і миття поверхонь приміщень (підлога, стіни, двері, віконні рами та скло, підвіконники тощо), предметів обстановки (тверді та м'які меблі, килими), медичних та інших приладів, апаратів, устаткування з гальванічним, лакофарбовим, полімерним та комбінованим покриттям, а також виготовлених зі скла і гуми, предметів догляду хворих (підкладні судна, міхури для льоду, грілки тощо) та особистої гігієни (гребінці, губки тощо), посуду (столового, кухонного, аптечного, лабораторного), іграшок, обладнання та устаткування аптечних закладів, обладнання, устаткування та тари харчоблоків закладів охорони здоров'я та дитячих дошкільних закладів, транспортних засобів, ємностей для збирання, накопичування, зберігання відходів та сміття, технологічного обладнання, устаткування, продуктопроводи, інвентар, тара підприємств фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, харчової та переробної промисловості, перукарських, манікюрних та косметологічних інструменти, вентиляційних систем, кондиціонерів, санітарно-технічного обладнання, прибирального інвентарю.

Характеристика мийно-дезінфікуючого засобу «КлінДез 401»

1.3. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб «КлінДез 401» («Clean&Dez 401») випускається у вигляді рідкого концентрату жовтуватого кольору з характерним запахом хлору. При зберіганні засобу можливе випадіння осаду, що не впливає на якість дезінфікуючих властивостей засобу.

Робочі розчини засобу мають антикорозійні, стабілізуючі, змочувальні, емульгуючі та мийні властивості. Не пошкоджують об'єкти, виготовлені з корозійностійких металів (у т.ч. з нержавіючої, хромнікелевої, низьковуглецевої сталі, заліза, алюмінію), склоемалі, матеріалів, покритих нікелем і латунню, скла, силікону, пластмас, гуми на основі силіконового та натурального каучуку, полімерних матеріалів, фарбованого та нефарбованого дерева, кахлю, керамічної плитки, лінолеуму, бетону, порцеляни, фаянсу. Не псують поверхні медичних та промислових апаратів, приладів, устаткування з гальванічним, лакофарбовим і полімерним покриттям, не знебарвлюють пофарбовані поверхні, не фіксують забруднення органічного походження на поверхнях виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці, можуть відбілювати текстильні вироби.

наведеними в табл. 2-о.

3.2. Поверхні в приміщеннях (підлога, стіни, віконні рами тощо), предмети обстановки (тверді меблі), поверхні приладів, апаратів, устаткування, візки для складання і транспортування білизни, стелажі для зберігання білизни протирають ганчір'ям, яке змочене розчином засобу, або зрошують із гідропульту, автомасу тощо. Норма витрати робочого розчину при використанні методом протирання складає 100 мл/м², при застосуванні методом зрошення - 150 мл/м² поверхні, що піддається обробці. Після закінчення дезінфекції приміщення провітрюють. Паркетну підлогу, меблі з дерева, у тому числі поліровані, після дезінфекції протирають сухим ганчір'ям.

3.3. Санітарно-технічне обладнання (ванни, раковини, унітази та ін.) обробляють розчином засобу за допомогою ганчір'я, щітки або йоржа, добре змочених в розчині або зрошують. Норма витрати розчину становить 200 мл/м² поверхні. Після проведення дезінфекції поверхні обладнання декілька разів промити водою. Приміщення провітрити на протязі 15 хв.

3.4. Медичні апарати, прилади, устаткування з лакофарбованим, гальванічним та полімерним покриттям протирають ганчір'ям, яке змочене робочим розчином, з наступним дотриманням відповідної експозиції.

3.25. На харчових та переробних підприємствах дезінфекцію поверхонь виробничих і допоміжних приміщень, технологічного, холодильного та іншого обладнання, ємностей, резервуарів, трубопроводів, інвентарю, тари, столового і кухонного посуду, прибирального інвентарю, текстильних виробів (в т.ч. спецодягу, сирних торбинок та ін.), засобів для миття посуду тощо здійснюють методами протирання, зрошення, заповнення (в т.ч. з циркуляцією розчину у СІР-системах), замочування, занурення. Конкретні режими зазначено у відповідній інструкції з використання дезінфікуючого засобу «КлінДез 401» («Clean&Dez 401») на підприємствах харчової промисловості.

Характеристика мийно-дезінфікуючого засобу «ДЕЗОлайт»

1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб «ДЕЗОлайт» являє собою рідкий прозорий безбарвний або жовтуватого кольору концентрат зі слабким специфічним запахом запашки. Розчин 1,0% засобу «ДЕЗОлайт» має $pH = 10,5 \pm 2,0$. Засіб добре розчиняється у воді і піниться при збовтуванні. Водні розчини засобу «ДЕЗОлайт» прозорі, безбарвні зі слабким специфічним запахом. Робочі розчини засобу мають мийні властивості, не спричиняють корозії виробів з металу, не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям; не фіксують білкові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту на об'єктах знезараження, гомогенізують мокротиння та інші біологічні виділення, не знебарвлюють тканини. Розчини засобу видаляють жирові та інші забруднення, плями крові та інших біологічних рідин з поверхонь, що піддаються знезараженню.

Теза: 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів
 "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", Квітень – Травень 2022 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1.

Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів
 "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті",
 Квітень – Травень 2022 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1.

7. Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241

Дар'я Благодир¹, Микита Іванов¹, Тетяна Пирог^{1,2}

¹ – Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

² – Інститут мікробіології та вірусології НАНУ, Київ, Україна

Вступ. Раніше було показано, що під час вирощування штаму *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на відходах виробництва біодизелю синтезуються поверхнево-активні речовини (ПАР), антимікробна і антиадгезивна активність яких була нижчою, ніж отриманих на очищеному субстраті чи етанолі. Одним з шляхів регуляції біологічної активності мікробних метаболітів є внесення у середовище культивування продуцента цільового продукту так званих біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів), у відповідь на наявність яких підвищується синтез та/або антимікробна активність метаболітів.

Матеріали і методи. Культивування штаму IMB B-7241 здійснювали на відходах виробництва біодизелю (5 %) за наявності як конкурентних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8 (живі та інактивовані клітини, а також супернатант). Штам ПАР *E. cloacae* C-8 вирощували на качалці упродовж 24 год на середовищі такого самого складу, як і продуцент ПАР з глюкозою (5 г/л) як джерелом вуглецю. Суспензію живих клітин *E. cloacae* C-8 і супернатант, отримані після центрифугування культуральної рідини, вносили у середовище культивування продуцента ПАР у кількості 2,5 %, інактивовані стерилізацією клітини – 10 % від об'єму середовища. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Антимікробну активність ПАР визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК).

Результати. Встановлено, що найефективнішими з використовуваних індукторів виявилися живі клітини *E. cloacae* C-8, а також супернатант після вирощування штаму C-8 на рідкому середовищі з глюкозою: внесення їх у середовище культивування продуцента поверхнево-активних речовин супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Escherichia coli* ІЕМ-1) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2) були в 8–33 рази нижчими, ніж встановлені для поверхнево-активних речовин, утворених на середовищі без цього індуктора. Використання як індуктора інактивованих клітин *E. cloacae* C-8 дало змогу підвищити антимікробну активність синтезованих ПАР у 2-19 разів порівняно з показниками, визначеними для препаратів, утворених без конкурентних бактерій. Одержані дані щодо вищої ефективності живих клітин індуктора та супернатанту порівняно з інактивованими клітинами можуть свідчити про те, що індукуючий фактор є як клітинно-зв'язаним, так і позаклітинним, а процес автоклавування клітин призводить до аанактивації цього фактора, частково пригнічуючи потенційні біохімічні взаємодії.

Висновки. Отже, в результаті проведеної роботи встановлено можливість регуляції антимікробної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 внесенням у середовище з відходами виробництва біодизелю клітин конкурентних грамнегативних бактерій *E. cloacae* C-8.

Теза: Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції (м. Харків, 13 жовтня 2022 р.). Х.: Вид-во НФаУ, 2022.- С. 219 (Серія «Наука»)

**ДЕСТРУКЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ БІОПЛІВОК ПІД ВПЛИВОМ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER
CALCOACETICUS* IMB B-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ
ENTEROBACTER CLOACAE C-8**

Благодир Д. О.¹, Іванов М. С.¹, Пирог Т. П.^{1,2}

1 – Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

2 – Інститут мікробіології та вірусології НАНУ, Київ, Україна

Вступ. На сьогодні своєї актуальності не втрачає пошук безпечних та ефективних сполук, які б руйнували бактеріальні біоплівки на різноманітних поверхнях, адже небезпека їх утворення, наприклад, на медичних приладах призводить до системних інфекцій, що вражають населення всього світу. До них належать насамперед інфекції катетерів, серцевих клапанів, протезів суглобів. Серед бактерій, виділених з цих медичних пристроїв, найбільшу небезпеку викликають *Staphylococcus epidermidis* і *Staphylococcus aureus*, оскільки вони

спричиняють близько 40–50 і 50–70 % інфекцій, пов'язаних із серцевими клапанами і катетерами відповідно [1].

З іншого боку, розвиток стійкості бактерій через неправильне використання антибіотиків і хімікатів може призвести до небезпечних наслідків для населення світу, тому терміново потрібні нові безпечні природні сполуки [2]. Зокрема, альтернативою антибіотикам можуть бути пробіотики, бактеріофаги, мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР). Окрім цього, останніми роками з'являється все більше інформації про використання так званих біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів), у відповідь на внесення яких у середовище культивування продуцента підвищується біологічна (зокрема, антимікробна) активність цільових продуктів [3]. Застосування біологічних індукторів може спричинити позитивний вплив і на здатність синтезованих за їх наявності мікробних метаболітів до руйнування біоплівок.

Мета дослідження. Дослідити здатність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності у середовищі культивування грамнегативних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8, руйнувати бактеріальні біоплівки.

Методи дослідження. Штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі з очищеним гліцерином як джерелом вуглецю та енергії (3%, об'ємна частка) за наявності біологічних індукторів (живі та інактивовані клітини *E. cloacae* C-8, а також супернатант). Суспензію живих клітин *E. cloacae* C-8 і відповідний супернатант після центрифугування культуральної рідини вносили у середовище культивування продуцента ПАР у кількості 2,5 %, інактивовані стерилізацією клітини – 10 % від об'єму середовища. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин бактеріальних тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Основні результати. Встановлено, що ступінь руйнування біоплівки *Staphylococcus aureus* БМС-1 та *Pseudomonas* sp. МІ-2 за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності усіх досліджуваних індукторів (живі, інактивовані клітини *E. cloacae* С-8, супернатант) був на 12-22 % вищим, ніж у разі використання поверхнево-активних речовин, одержаних у середовищі без індукторів. У той же час використання як індуктора супернатанту після вирощування *E. cloacae* С-8 не спричиняло позитивного ефекту на здатність синтезованих за його наявності ПАР руйнувати біоплівки *Escherichia coli* ІЕМ-1 та *Bacillus subtilis* БТ-2 (див. таблицю).

Внесення у середовище культивування продуцента поверхнево-активних речовин живих та інактивованих клітин *E. cloacae* С-8 супроводжувалося утворенням ПАР, під впливом яких спостерігали найвищий ступінь деструкції біоплівки грамнегативних бактерій *Pseudomonas* sp. МІ-2 та *E. coli* ІЕМ-1, який досягав 70-85 %, що вище, ніж за дії препаратів, синтезованих без індуктора (55-60 %). Відсоток руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 за використання ПАР, утворених за наявності живих та інактивованих клітин індуктора, перебував на рівні 64-69 %, у той же час як у разі використання ПАР,

одержаних у середовищі без індукторів становив 61 і 43 % відповідно (див. таблицю).

Руйнування бактеріальних біоплівки за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності біологічних індукторів

Біологічний індуктор	Руйнування біоплівки (%)			
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2
Контроль (без індуктора)	60	61	43	55
Живі клітини	84	69	65	70
Інактивовані клітини	85	65	64	74
Супернатант	58	51	65	67

Примітка. Концентрація ПАР у розчинах становила 640 мкг/мл. Під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5%.

Найбільша різниця (22-25 %) у деструкції біоплівки під впливом ПАР, синтезованих за наявності у середовищі індукторів і без них, встановлена для *E. coli* ІЕМ-1 (індуктор – живі та інактивовані клітини *E. cloacae* С-8), *S. aureus* БМС-1 (індуктор – живі, інактивовані клітини *E. cloacae* С-8, а також відповідний супернатант) та *Pseudomonas* sp. МІ-2 (індуктор – інактивовані клітини *E. cloacae* С-8).

Висновки. Таким чином, отримані результати свідчать про можливість регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, внесенням у середовище культивування продуцента конкурентних бактерій *E. cloacae* С-8, у відповідь на наявність яких синтезувалися ПАР з підвищеною здатністю до руйнування бактеріальних біоплівки.

Список літератури

1. Tasneem U., Yasin N., Nisa I., Shad F., Rasheed U., Momin F., Zaman S., Qasim M. Biofilm producing bacteria: A serious threat to public health in developing countries. *J. Food Sci. Nutr.* 2018. Vol. 1 (2). P. 25-31.
2. Łojewska E., Sakowicz T. An Alternative to Antibiotics: Selected Methods to Combat Zoonotic Foodborne Bacterial Infections. *Current Microbiology.* 2021. Vol. 78 (12). P. 4037–4049.
3. Wang D., Wei L., Zhang Y., Zhang M., Gu S. Physicochemical and microbial responses of *Streptomyces natalensis* HW-2 to fungal elicitor. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2017. Vol. 101 (17). P. 6705–6712.

Теза: Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції : Програма та тези матеріалів XI Міжнародної науково-технічної конференції, 8 листопада 2022 р., м. Київ. – К.: НУХТ, 2022 р. – 339 с.

УДК 579.663

**3. ВПЛИВ НА БІОПЛІВКИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА
НАЯВНОСТІ КОНКУРЕНТНИХ ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ**

Д. О. Благодир, М. С. Іванов, Т. П. Пирог

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

На сьогоднішній день проблемою поширення понад 80% хронічних і гострих інфекцій вважаються бактеріальні біоплівки. Утворення біоплівки на катетерах, протезах та імплантах визнані причиною серйозних хронічних інфекцій у лікарнях. Попередні дослідження щодо регуляції властивостей поверхнево-активних речовин (ПАР) показали можливість регуляції антимікробної активності ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 внесенням у середовище культивування продуцента клітин конкурентних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8. Такий підхід також може бути ефективним для підвищення здатності мікробних метаболітів до руйнування біоплівок.

Мета роботи полягала у дослідженні здатності поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності біологічних індукторів, руйнувати бактеріальні біоплівки.

Як індуктори використовували живі та інактивовані автоклавуванням клітини *E. cloacae* C-8, а також супернатант після вирощування штаму C-8, які вносили у кількості 2,5–10% (об'ємна частка) у середовище з відходами виробництва біодизелю (5%, об'ємна частка) на початку процесу культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин бактеріальних тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Найвищий ступінь руйнування біоплівок бактеріальних тест-культур за обробки

ПАР, синтезованих за наявності усіх досліджуваних індукторів (живі, інактивовані клітини *E. cloacae* С-8, супернатант) спостерігався за дії найвищих з досліджуваних концентрацій поверхнево-активних речовин (640-320 мкг/мл).

Встановлено, що ступінь руйнування біоплівки *Escherichia coli* ІЕМ-1 та *Pseudomonas* sp. МІ-2 за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності живих клітин та супернатанту після вирощування індуктора був на 7-30 % вищим, ніж у разі використання поверхнево-активних речовин, одержаних у середовищі без індукторів. Використання як індукторів інактивованих клітин супроводжувалось утворенням ПАР, під впливом яких деструкція біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 та *Pseudomonas* sp. МІ-2 практично не відрізнялася від такої за дії препаратів, синтезованих у середовищі без індуктора (44-55 та 67-70 % відповідно).

У той же час відсоток руйнування біоплівки *Bacillus subtilis* БТ-2 та *Staphylococcus aureus* БМС-1 за використання ПАР, утворюваних за наявності живих клітин індуктора, перебував на рівні 70-72 %, у той же час як під впливом ПАР, одержаних у середовищі без індукторів, становив 58 і 50 % відповідно. Внесення ж у середовище культивування продуцента ПАР супернатанту після вирощування *E. cloacae* С-8, супроводжувалося утворенням ПАР, за дії яких спостерігали найвищий ступінь руйнування біоплівки грампозитивних бактерій *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1, який досягав 73-82 %, і був вищим на 20-30 % порівняно з деструкцією за дії препаратів, одержаних без індуктора.

Отже, в результаті проведеної роботи встановлено можливість підвищення ступеня руйнування бактеріальних біоплівок під впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності у середовищі культивування продуцента клітин конкурентних бактерій *E. cloacae* С-8. Важливо, що за таких умов культивування суттєво підвищувався ступінь руйнування бактеріальних біоплівок за дії ПАР, отриманих на токсичних промислових відходах виробництва біодизелю.

Теза: Науково-практична конференція з міжнародною участю школи молодих науковців АТ«Фармак»: «Наука та сучасне фармацевтичне виробництво», 28 жовтня 2022 р., м. Київ. – 87 с.

ГРАМНЕГАТИВНІ КОНКУРЕНТНІ БАКТЕРІЇ ЯК ФАКТОР РЕГУЛЯЦІЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Благодир Д. О., Іванов М.С. Пирог Т. П.

Вступ. На сьогодні своєї актуальності не втрачає пошук безпечних та ефективних сполук, які б руйнували бактеріальні біоплівки на різноманітних поверхнях, адже понад 80 % хронічних і гострих інфекцій спричиняють бактеріальні біоплівки. Зокрема, через неправильне використання антибіотиків створюється небезпека антибіотикорезистентності бактеріальних збудників інфекцій у найближчому майбутньому, тому терміново потрібні безпечні природні речовини, як, наприклад, бактеріофаги, мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), ферменти. Окрім цього, все більше дослідників намагаються регулювати біологічну активність мікробних метаболітів, тому розробка підходів, що дають змогу отримати цільовий продукт з високою біологічною активністю є актуальним напрямком сьогодення. Зокрема, це використання біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів), у відповідь на внесення яких у середовище культивування продуцента підвищується біологічна (зокрема, антимікробна) активність цільових продуктів. Попередні дослідження щодо регуляції властивостей поверхнево-активних речовин (ПАР) показали можливість регуляції антимікробної активності ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 внесенням у середовище культивування продуцента клітин конкурентних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8.

Мета дослідження. Дослідити здатність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності у середовищі культивування грамнегативних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8, руйнувати бактеріальні біоплівки.

Матеріали та методи. Штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі з очищеним гліцериним як джерелом вуглецю та енергії (3%, об'ємна частка) за наявності біологічних індукторів (живі та інактивовані клітини *E. cloacae* C-8, а також супернатант). Суспензію живих клітин *E. cloacae* C-8 і відповідний супернатант після центрифугування культуральної рідини вносили у середовище культивування продуцента ПАР у кількості 2,5 %, інактивовані стерилізацією клітини – 10 % від об'єму середовища. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як

різницю між адгезією клітин бактеріальних тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Основні результати. Встановлено, що ступінь руйнування біоплівок *Escherichia coli* IEM-1 та *Pseudomonas* sp. MI-2 за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності живих клітин та супернатанту після вирощування індуктора, був на 7-30 % вищим, ніж у разі використання поверхнево-активних речовин, одержаних у середовищі без індукторів. У той же час використання як індуктора інактивованих клітин *E. cloacae* C-8 не спричиняло позитивного ефекту на здатність синтезованих за його наявності ПАР руйнувати біоплівки *E. coli* IEM-1 та *Pseudomonas* sp. MI-2. Внесення супернатанту після вирощування *E. cloacae* C-8 у середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 не впливало на здатність синтезованих ПАР руйнувати біоплівку *Bacillus subtilis* БТ-2. У той же час деструкція біоплівок *B. subtilis* БТ-2 та *Staphylococcus aureus* БМС-1 за використання ПАР, утворених за наявності живих та інактивованих клітин індуктора, становила 64-69 %, що вище порівняно з дією поверхнево-активних речовин, синтезованих у середовищі без індукторів (43-61%).

Висновки. Отже, в результаті проведеної роботи встановлено можливість підвищення ступеня руйнування бактеріальних біоплівок під впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності у середовищі культивування продуцента клітин грамнегативних конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8.

Теза: 89 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів
 "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", 3-7 квітня 2023 р. – К.: НУХТ, 2023 р. – Ч.1. – 433 с.

89 International scientific conference of young scientist and students
 "Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution",
 April, 3–7, 2023. Book of abstract. Part 1. NUFT, Kyiv.

11. Деструкція дріжджових біоплівки за дії поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих за наявності грамнегативних бактерій

Дар'я Благодир¹, Микита Іванов¹, Тетяна Пирог^{1,2}

¹ – Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

² – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, Київ, Україна

Вступ. Утворення біоплівки на медичних приладах (імплантатах, катетерах) є причиною виникнення гострих інфекцій за рахунок зниженої чутливості патогенних мікроорганізмів до дії антибіотиків. Альтернативними рішеннями цієї проблеми є пошук нових альтернативних антибіотикам препаратів, якими можуть бути поверхнево-активні речовини (ПАР); а також внесення у середовище культивування продуцента антимікробних метаболітів так званих біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів), за наявності яких підвищується синтез та/або біологічна активність цільових продуктів.

Матеріали і методи. Штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі з відходами виробництва біодизелю як джерелом вуглецю та енергії (5%, об'ємна частка) за наявності біологічних індукторів (живі та інактивовані клітини *Enterobacter cloacae* C-8, а також супернатант). Суспензію живих клітин *E. cloacae* C-8 і відповідний супернатант вносили у середовище у кількості 2,5 %, інактивовані стерилізацією клітини – 10 % (об'ємна частка). ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин дріжджових тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Результати. Встановлено, що внесення як живих, так й інактивованих клітин конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8 в середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 супроводжувалося синтезом поверхнево-активних речовин, за дії яких ступінь руйнування біоплівки дріжджових тест-культур *Candida albicans* Д-6 та *Candida tropicalis* РЕ-2 був у середньому на 7-13 % вищим, ніж у разі використання ПАР, одержаних у середовищі без індукторів. Найвищий ступінь руйнування біоплівки (84-85 %) спостерігався для тест культури *C. albicans* Д-6 після обробки препаратами ПАР синтезованих за наявності живих клітин *E. cloacae* C-8. Рівень деструкції біоплівки *C. albicans* Д-6 перевищував 80 % тільки за високих (160-640 мкг/мл) концентрацій розчинів препаратів поверхнево-активних речовин, утворених за наявності індуктора.

У разі використання як індуктора супернатанту після вирощування конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8 спостерігали синтез ПАР, які характеризувалися підвищеною здатністю до руйнування біоплівки тест-культури *C. albicans* Д-6, а деструкція біоплівки *C. tropicalis* РЕ-2 практично не відрізнялися від такої після обробки розчинами поверхнево-активних речовин, одержаних у середовищі без індукторів.

Висновки. Встановлено, що за внесення клітин грамнегативних конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8 у середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтезуються поверхнево-активні речовини, які є ефективнішими деструкторами дріжджових біоплівки порівняно з ПАР, синтезованими без додавання індукторів у середовище культивування продуцента.

Теза: Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування: матеріали
Міжнар. наук. конф., 27-28 квітня 2023 р. / Держ. біотехнол. ун-т. – Х., 2023.

РУЙНУВАННЯ ДРІЖДЖОВИХ БІОПЛІВОК ПІД ВПЛИВОМ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 ЗА НАЯВНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНДУКТОРІВ

Д.О. Благодир¹, М.С. Іванов¹, Т.П. Пирог^{1,2}

¹ Національний університет харчових технологій

² Інститут мікробіології та вірусології НАНУ

dasha.blagodir@gmail.com

Вступ. Однією з властивостей мікроорганізмів є їх здатність формувати біоплівку, небезпека утворення якої наприклад, на медичних приладах (імплантатах, катетерах) може призводити до системних інфекцій, які вражають населення всього світу. За даними ВООЗ через надмірне та необґрунтоване використання антибіотиків антибіотикорезистентність стала найгострішою проблемою людства [1]. У зв'язку з цим є необхідність пошуку нових альтернативних антибіотикам препаратів, якими можуть бути мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР). Крім того, останніми роками набуває популярності так зване «спільне культивування», в результаті якого у відповідь на наявність біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів) у середовищі культивування продуцента антимікробних сполук підвищується їх біологічна (зокрема, антифунгальна) активність [2]. Так у разі культивування певних новостворених асоціацій молочнокислих бактерій спостерігали підвищення антимікробної активності синтезованих бактеріоцинів [3].

Оскільки одним з механізмів деструкції біоплівок за дії мікробних ПАР є антимікробна активність цих продуктів мікробного синтезу, ми припустили, що внесення біологічних індукторів у середовище культивування продуцента ПАР буде супроводжуватися синтезом цільового продукту з підвищеною здатністю до руйнування дріжджових біоплівок.

Мета дослідження. Дослідити здатність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності у середовищі культивування грамнегативних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8, руйнувати дріжджові біоплівки.

Матеріали і методи. Штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі з гліцерином як джерелом вуглецю та енергії (3%, об'ємна частка) за наявності біологічних індукторів (живі та інактивовані клітини *E. cloacae* C-8, а також відповідний супернатант). Суспензію живих клітин *E. cloacae* C-8 і супернатант вносили у середовище у кількості 2,5 %, інактивовані стерилізацією клітини – 10 % (об'ємна частка). ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин дріжджових тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Результати. Встановлено, що внесення як інактивованих клітин, так і супернатанту після вирощування конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8 в середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 супроводжувалося синтезом поверхнево-активних речовин, за дії

яких ступінь руйнування біоплівки дріжджових тест-культур *Candida albicans* Д-6 та *Candida tropicalis* РЕ-2 був у середньому на 13-24% вищим, ніж у разі використання ПАР, одержаних у середовищі без індукторів (таблиця).

Найвищий ступінь руйнування біоплівки (78-86 %) спостерігався для тест культури *C. albicans* Д-6 після обробки препаратами ПАР синтезованих за наявності супернатанту після вирощування *E. cloacae* С-8. Деструкція біоплівки *C. albicans* Д-6 була максимальною (83-86%) тільки за високих (320-640 мкг/мл) концентрацій розчинів препаратів поверхнево-активних речовин, утворених за наявності індуктора (див. таблицю).

Таблиця – Руйнування дріжджових біоплівок під впливом ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB В-7241 за наявності конкурентних бактерій *E. cloacae* С-8

Тест-культура	Стан клітин індуктора	Деструкція біоплівки (%) за концентрації ПАР (мкг/мл)				
		640	320	160	80	40
<i>Candida albicans</i> Д-6	Без індуктора	65	60	58	55	55
	Живі	82	77	78	75	66
	Інактивовані	78	74	69	62	57
	Супернатант	86	83	80	80	78
<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	Без індуктора	61	52	43	41	40
	Живі	67	59	57	49	43
	Інактивовані	84	79	74	69	56
	Супернатант	85	80	72	71	62

За наявності інактивованих клітин *E. cloacae* С-8 і супернатанту у середовищі культивування штаму IMB В-7241 спостерігали синтез ПАР, за дії яких руйнування біоплівки *C. tropicalis* РЕ-2 було майже на 20 % вищим, ніж у разі використання живих клітин індуктора (див. таблицю).

Висновки. Отже, за внесення грамнегативних конкурентних бактерій *E. cloacae* С-8 у середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 синтезувалися поверхнево-активні речовини, які характеризувалися вищою здатністю до руйнування біоплівок дріжджів роду *Candida* порівняно з ПАР, утвореними без індуктора.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Maganaa M., Seretia C., Ioannidis A., Mitchell C. A., Balle A. R., Magiorkinis E., Chatzipanagiotou S., Hamblin M. R., Hadjifrangiskou M., Tegos G. P. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. Clin. Microbiol. Rev. 2018, 31(3). pii: e00084-16. doi: 10.1128/CMR.00084-16.
2. Hifnawy S. M., Hassan H. M., Mohammed R., Fouda M. M., Sayed A. M., Hamed A. A., Abdelmohsen U. R. Induction of antibacterial metabolites by co-cultivation of two red-sea-sponge-associated Actinomycetes Micromonospora sp. UR56 and Actinokinetes sp. EG49. Marine Drugs. 2020. Vol. 18, No 5. P. 243.
3. Matevosyan, L., Bazukya, I., Trchounian, A. Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. BMC Microbiology. 2019, 19(1): 46-63. doi: 10.1186/s12866-019-1475-x.

Теза: «Біотехнологія ХХІ століття»: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції, 19 травня 2023. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023, 333с.

**ВПЛИВ КОНКУРЕНТНИХ ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ НА
ЗДАТНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER
CALCOACETICUS* IMB B-7241 РУЙНУВАТИ БАКТЕРІАЛЬНІ
БІОПЛІВКИ**

Благодир Д. О.

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

dasha.blagodir@gmail.com

Вступ. На сьогодні встановлено, що майже усі досліджені види бактерій утворюють біоплівки, які характеризуються високою небезпекою, оскільки понад 80 % хронічних захворювань і близько 60 % усіх внутрішньо лікарняних інфекцій спричиняються мікроорганізмами у складі біоплівок, які можуть формуватися наприклад, на медичних приладах (імплантатах, катетерах) [1]. Тому актуальним є пошук нових сполук природного походження, які можуть бути ефективними деструкторами бактеріальних біоплівок [2]. Одними з таких перспективних біоцидів є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР). З літератури відомо про можливість регуляції біологічної активності мікробних вторинних метаболітів внесенням у середовище культивування продуцента цільового продукту так званих біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів), у відповідь на наявність яких підвищується синтез та/або антимікробна активність цільового продукту [3].

Раніше було встановлено, що за наявності конкурентних грамнегативних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8 у середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 спостерігали підвищення антимікробної активності синтезованих поверхнево-активних речовин порівняно з препаратами, утвореними без даного індуктора. Оскільки одним із механізмів деструкції біоплівок за дії мікробних ПАР є їх антимікробна активність, припустили, що внесення біологічних індукторів у середовище культивування продуцента поверхнево-активних речовин буде супроводжуватися синтезом ПАР з підвищеною здатністю до руйнування бактеріальних біоплівок.

Мета дослідження. Дослідити здатність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності у середовищі культивування грамнегативних бактерій *E. cloacae* C-8, руйнувати бактеріальні біоплівки.

Методи дослідження. Культивування штаму IMB B-7241 здійснювали у рідкому мінеральному середовищі з гліцерином (3 %, об'ємна частка) за наявності живих або інактивованих клітин *E. cloacae* C-8, або відповідного супернатанту. Як джерело вуглецю для вирощування *E. cloacae* C-8 використовували глюкозу (5 г/л). Суспензію живих клітин *E. cloacae* C-8 і супернатант вносили у середовище культивування продуцента ПАР у кількості 2,5 %, інактивовані автоклавуванням клітини – 10 % від об'єму середовища. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішню хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин бактеріальних тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Основні результати. Встановлено, що ступінь руйнування біоплівки *Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1 та *Pseudomonas* sp. МІ-2 під впливом ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності супернатанту, був на 13-25 % вищим, ніж у разі використання поверхнево-активних речовин, одержаних у середовищі без індуктора, причому найвищий ступінь руйнування біоплівки (80-84 %) спостерігався для тест-культур *Pseudomonas* sp. МІ-2 та *E. coli* IEM-1 (див. таблицю).

Таблиця. Деструкція бактеріальних біоплівки під впливом ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності конкурентних бактерій *E. cloacae* С-8

Біологічний індуктор	Руйнування біоплівки, %			
	<i>Escherichia coli</i> IEM-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2
Контроль (без індуктора)	60	61	43	55
Живі клітини	74	59	69	74
Інактивовані клітини	58	63	68	70
Супернатант	84	74	62	80

Примітка. Концентрація ПАР у розчинах становила 640 мкг/мл. Під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5%.

У разі використання ПАР, утворюваних за наявності живих та інактивованих клітин індуктора, відсоток руйнування біоплівки *E. coli* IEM-1 та *Pseudomonas* sp. МІ-2 перебував на рівні 58-74 %, у той же час як у разі використання ПАР, одержаних у середовищі без індукторів становив 60 і 55 % відповідно. Внесення ж у середовище культивування продуцента ПАР інактивованих клітин *E. cloacae* С-8, супроводжувалося утворенням ПАР, за дії яких ступінь руйнування біоплівки грампозитивних бактерій *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 досягав 63-68 %, і був вищим на 2-25 % порівняно з деструкцією за дії препаратів, одержаних без індуктора (див. таблицю).

Висновки. Таким чином, отримані результати свідчать про можливість підвищення ступеня руйнування бактеріальних біоплівки під впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності у середовищі культивування продуцента конкурентних грамотригативних бактерій *E. cloacae* С-8.

Список використаної літератури:

1. Ciofu O., Rojo-Molinero E., Macià M. D., Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. APMIS. 2017, 125 (4): 304-319.
2. Maganaa M., Seretia C., Ioannidis A., Mitchell C. A., Balle A. R., Magiorkinis E., etc. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. Clin. Microbiol. Rev. 2018, 31(3). pii: e00084-16. doi: 10.1128/CMR.00084-16.
3. Hifnawy S. M., Hassan H. M., Mohammed R., Fouda M. M., Sayed A. M., Hamed A. A., etc. Induction of antibacterial metabolites by co-cultivation of two red-sea-sponge-associated *Actinomyces Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinetespora* sp. EG49. Marine Drugs. 2020, 18 (5): 243.

Теза: Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали III міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. (24 березня 2023 р., м. Харків). – Х.: НФаУ, 2023. – 443

с.

**Вплив грамнегативних бактерій на синтез поверхнево-активних речовин
Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 з високою біологічною активністю**

¹Благодир Д.О., ¹Іванов М.С., ^{1,2}Пирог Т.П.

¹Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

²Інститут мікробіології та вірусології НАНУ, Київ, Україна

dasha.blagodir@gmail.com

Вступ. Однією з властивостей мікроорганізмів є їх здатність адгезуватися на поверхні різних матеріалів і формувати біоплівку, небезпека утворення якої наприклад, на медичних приладах (імплантатах, катетерах) може призводити до системних інфекцій людей. У зв'язку з цим можливими рішеннями даної проблеми є: пошук нових антимікробних препаратів, якими можуть бути поверхнево-активні речовини (ПАР); а також використання такого методу як «co-cultivation», в результаті якого у відповідь на використання так званих біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів) у середовищі культивування продуцента підвищується біологічна (зокрема, антимікробна) активність цільових продуктів.

Раніше було встановлено, що під час культивування штаму *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на відходах виробництва біодизелю спостерігали синтез поверхнево-активних речовин (ПАР), антимікробна активність яких була нижчою порівняно з активністю поверхнево-активних речовин, одержаних на очищеному гліцерині. Вибір такого типу субстрату для біосинтезу ПАР зумовлений необхідністю утилізації великої кількості токсичних промислових відходів, які стають дедалі більшою проблемою сьогодення. На нашу думку, внесення біологічних індукторів у середовище культивування продуцента ПАР з відходами виробництва біодизелю дасть змогу, по-перше, підвищити біологічну активність синтезованого цільового продукту, по-друге, утилізувати токсичні промислові відходи.

Методи дослідження. Штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі з відходами виробництва біодизелю (5%,

об'ємна частка) за наявності живих клітин *E. cloacae* C-8. Суспензію живих клітин *E. cloacae* C-8 вносили у середовище у кількості 2,5 %. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин бактеріальних тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Основні результати. Встановлено, що суттєва різниця (більше 10 %) у деструкції біоплівок грампозитивних бактерій *Bacillus subtilis* БТ-2 та *Staphylococcus aureus* БМС-1 за наявності ПАР, синтезованих за наявності індуктора і без нього спостерігалася лише у разі використання ПАР у найвищих з досліджуваних концентрацій (320-640 мкг/мл). Відсоток руйнування біоплівок *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 за використання ПАР, утворених за наявності живих клітин індуктора, перебував на рівні 70-72 %, у той же час як у разі використання ПАР, одержаних у середовищі без індукторів становив 58 і 50 % відповідно.

Внесення у середовище культивування продуцента поверхнево-активних речовин живих клітин індуктора *E. cloacae* C-8 супроводжувалося утворенням ПАР, під впливом яких спостерігали найвищий ступінь деструкції біоплівок грамнегативних бактерій *Pseudomonas* sp. МІ-2 та *E. coli* ІЕМ-1, який досягав 94-95 %, що вище, ніж за дії препаратів, синтезованих без індуктора (55-89 %). У разі використання нижчих за 40 мкг/мл концентрацій ПАР, одержаних при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю за наявності живих клітин індуктора, деструкція бактеріальних біоплівок не відрізнялась від такої за дії препаратів, синтезованих без індуктора.

Висновки. Таким чином, отримані результати свідчать про можливість підвищення ступеня руйнування бактеріальних біоплівок під впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності у середовищі культивування продуцента живих клітин конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8.

Теза: Хімія, біотехнологія, екологія та освіта: Збірник матеріалів VII Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (м. Полтава, 17-18 травня 2023 року). –

Полтава, 2023. – 502 с

**ВПЛИВ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ІНДУКТОРА НА
БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241**

Благодир Д. О., Іванов М. С., Пирог Т. П. (м. Київ)

Здатність дріжджів роду *Candida* формувати біоплівку на медичному обладнанні призводить до збільшення відсотку (понад 60 %) внутрішньо лікарняних інфекцій [1]. Враховуючи, що на теперішній час певним видам роду *Candida*, наприклад, *Candida albicans*, уже притаманна висока резистентність до існуючих антифунгальних препаратів, постає необхідність пошуку нових безпечних природних біоцидів [2]. Одними з таких перспективних деструкторів біоплівок є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), які характеризуються високою біологічною активністю.

З літератури відомо, що у відповідь на внесення у середовище культивування продуцента цільового продукту так званих біологічних індукторів (конкурентних мікроорганізмів) у різному фізіологічному стані підвищується антифунгальна активність синтезованих метаболітів, яка є одним із основних механізмів деструкції дріжджових біоплівок [3]. Зазначимо, що літературні дані свідчать про різну ефективність використання як індукторів живих, інактивованих клітин чи відповідного супернатанту, що свідчить про різні механізми регуляції активності антимікробних сполук.

Попередні наші дослідження показали можливість регуляції антифунгальної активності ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 внесенням у середовище культивування продуцента живих клітин конкурентних бактерій *Enterobacter cloacae* C-8.

Мета даної роботи полягала у дослідженні здатності поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності у середовищі культивування біологічного індуктора у різному фізіологічному стані, руйнувати дріжджові біоплівки.

Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснювали у рідкому середовищі з гліцерином (3%, об'ємна частка) за наявності інактивованих клітин *E. cloacae* C-8, а також відповідного супернатанту після вирощування штаму C-8 у рідкому середовищі з глюкозою (0,5%). Інактивовані автоклавуванням клітини *E. cloacae* C-8 вносили у середовище у кількості 10 %, а відповідний супернатант – 2,5 % (об'ємна частка). ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин дріжджових тест-культур у необроблених і оброблених ПАР лунках імунологічного планшета.

Встановлено, що внесення як інактивованих клітин конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8, так й відповідного супернатанту в середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 супроводжувалося синтезом поверхнево-активних речовин, за дії яких ступінь руйнування біоплівок дріжджових тест-культур *C. albicans* Д-6 та *Candida tropicalis* PE-2 був у середньому на 13-21 % вищим, ніж у разі використання ПАР, одержаних у середовищі без індукторів. Найвищий ступінь руйнування біоплівки (86 %) спостерігався для тест-культури *C. albicans* Д-6 після обробки препаратами ПАР синтезованих за наявності супернатанту після вирощування *E. cloacae* C-8. Зазначимо, що деструкція біоплівок *C. albicans* Д-6 та *C. tropicalis* PE-2 була максимальною (78-86 %) під впливом утворених за наявності індукторів поверхнево-активних речовин у концентрації 320-640 мкг/мл. У разі використання нижчих за 10 мкг/мл концентрацій ПАР, одержаних при культивуванні *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності супернатанту після вирощування клітин індуктора, деструкція дріжджових біоплівок була в середньому на 18 % вищою, порівняно із дією ПАР, синтезованих без індуктора.

Таким чином, отримані результати свідчать про можливість регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 внесенням у середовище культивування продуцента конкурентних бактерій *E. cloacae* C-8 у різному фізіологічному стані, у відповідь на наявність яких синтезувалися ПАР з підвищеною здатністю до руйнування дріжджових біоплівок.

Список використаних джерел:

1. Ciofu O., Rojo-Molinero E., Macià M. D., Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017, 125 (4): 304-319.
2. Jung, P., Mischo, C. E., Gunaratnam, G., Spengler, C., Becker, S. L., Hube, B. etc. *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence*. 2020, 11(1): 1453–1465. doi:10.1080/21505594.2020.1836902.
3. Hifnawy S. M., Hassan H. M., Mohammed R., Fouda M. M., Sayed A. M., Hamed A. A., etc. Induction of antibacterial metabolites by co-