

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«___» _____ червня 2023 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(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: «Використання *Paracoccus haeundaensis* для біосинтезу наночастинок золота»

Виконала: здобувачка IV курсу, групи 1

Дзюба Марія Володимирівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Скроцька Оксана Ігорівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент _____

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я як 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

ДЗЮБИ Марії Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Використання *Paracoccus haeuundaensis* для біосинтезу наночастинок золота»

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

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

2. затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кв

3. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

4. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Paracoccus haeuundaensis* BC74171;
цільовий продукт: наночастинки золота;

5. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування;
обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис
технологічної схеми; контроль виробництва.

6. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема синтезу наночастинок золота- 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема синтезу наночастинок золота- 1 аркуш формату А1

1. Консультанти розділів роботи

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

2. 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>	01.03.2023-08.03.23	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	09.03.23-18.03.23	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	19.03.23-26.03.23	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	27.03.23-05.04.23	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	06.04.23-13.04.23	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	14.04.23-24.04.23	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	25.04.23-04.05.23	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	05.05.23 – 22.05.23	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	23.05.23-31.05.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Марія ДЗЮБА _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Оксана СКРОЦЬКА _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Для написання кваліфікаційної роботи було на меті розробити технологічну та апаратурну схеми біотрансформації наночастинок золота з використанням супернатанту біологічного агента *Paracoccus haeundaensis* BC74171, який одержують після 48 год культивування. Далі протягом 15 хв при температурі 70°C в супернатант додають тетрахлораурат водню 1 М та отримують наночастинки сферичної форми розміром в середньому 21 нм. Наночастинки золота, маючи особливість поверхневого плазмонного резонансу та високу спорідненість до атомів сірки, використовуються фототермічній і фотодинамічній терапії, візуалізація тканин, як платформа для доставки ліків в солідні пухлину, мають деяку антибактеріальну активність. Розрахована потужність виробництва є 5,85 г наночастинок з 62 л культуральної рідини за 30 трудоднів, що забезпечить для лікування 2,5% пацієнтів з солідними злоякісними пухлинами.

Технологічна схема біосинтезу наночастинок золота включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування 15%-их розчинів хлороводню та їдкого натру, приготування і стерилізація розчину мікроелементів, підготовка і стерилізація поживних середовищ для вирощування продуцента, приготування і стерилізація 1 М тетрахлораурату водню) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування *Paracoccus haeundaensis* у ферментері об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0.6, центрифугування для отримання супернатанту, виробничий біосинтез наночастинок золота в реакторі 10 л). Технологія отримання наночастинок золота включає в себе одностадійну схему культивування глибинним періодичним способом, супернатант-опосередкованого синтезу наночастинок, ультрацентрифугування, ліофілізація.

Кваліфікаційна робота представлена на 85 сторінках, містить 15 таблиць, 12 рисунків, складається зі вступу, 10 розділів, списку використаної літератури (63 найменувань), технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем, схема біосинтезу біомаси.

Ключові слова: наночастинки золота, AuNPs, *Paracoccus haeundaensis* BC74171, платформа для доставки ліків, супернатант.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА	7
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та живильного середовища для його культивування	11
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Paracoccus haeundaensis</i> BC74171	16
2.3. Таксономічний статус <i>Paracoccus haeundaensis</i> BC74171	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	18
3.1. Передумови виробництва ліків для боротьби з раком	18
3.2. Фармакологічні особливості наночастинок золота	18
3.3. Лікарський засіб на основі наночастинок золота	19
3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського препарату	20
3.5 Розрахунок місячної потужності отримання наночастинок золота супернатант-опосередкованою технологією, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.	21
3.6 Розрахунок кількості стадій підготовки стартової культури	22
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ	24
4.1. Шляхи катаболізму глюкози у <i>Paracoccus haeundaensis</i>	24
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у біомасу <i>Paracoccus haeundaensis</i> .	26
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	33
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та культивування <i>Paracoccus haeundaensis</i>	33
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	33

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря для аерації культуральної рідини	35
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	36
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	47
5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення та очищення, сушіння наночастинок золота	51
5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів для отримання субстанції наночастинок золота.	53
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та культивування <i>Paracoccus haeundaensis</i>	55
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та культивування... ..	57
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	64
8.1. Мікробіологічний контроль	64
8.2. Показники росту продуцента.....	65
8.2.1. Концентрація біомаси	65
8.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту	65
8.3. Характеристика наночастинок золота	66
8.3.1. Спектрофотометричний аналіз	66
8.3.2. Трансмісійна електронна мікроскопія	67
8.3.3. Вимірювання середнього діаметру та дзета-потенціалу	68
РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	69
9.1 Системи знешкодження рідких відходів	71
9.2 Системи знешкодження газоподібних відходів.....	74
9.3 Системи знешкодження твердих відходів	76
РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	77
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	79

ВСТУП

Наночастинки золота викликають величезний інтерес протягом останніх кількох десятиліть, оскільки вони володіють новими властивостями, такими як інтенсивний плазмонний резонанс, електрична, магнітна, теплопровідність, біостабільність, каталітична активність, протипухлинна активність [1].

Синтез наночасток золота може бути досягнутим хімічними та фізичними методами. Хімічний синтез передбачає використання хімічних реагентів (борогідрид натрію), які діють як відновники та стабілізатори, тоді як фізичні методи передбачають використання високих зовнішніх сил (температура та тиск) для розщеплення матеріалів на наночастки. Однак при використанні звичайних методів синтезу утворюються токсичні побічні продукти, які загрожують живим організмам і навколишньому середовищу [2].

Тому було знайдено більш екологічні підходи до синтезу Au-NPs за допомогою бактерій, рослин і грибів. Вони в свою чергу виділяють ряд ферментів, білків, вітамінів, які діють як відновлювачі, так і стабілізатори для запобігання агломерації. Зокрема багато морських мікроорганізмів відіграють важливу роль у виготовленні наноструктурованих мінеральних кристалів і металевих наноматеріалів із вражаючими властивостями, такими як форми, розміри, розташування та композиції, подібні до хімічних [3].

Потрібно зазначити, що ДНК, ферменти, антитіла та деякі функціональні полімери можуть бути легко кон'юговані з AuNP, в більшості випадків не впливаючи на їхню активність. Це та особливість, яка спонукала дослідників вивчити остаточний потенціал AuNP для біомедичних цілей, особливо для терапії раку та доставки ліків.

Змн.	рк.	докум.	Підпис	Дата	04.01.37КР ПЗ			
Розроб.		Дзюба М.В.						шіє
Консульт.								
Керівник		О.І.Скороцька						
Н. Контр.								
Зав.каф.		В.П.Стабніков						
БТМ								7

Тому що наночастинки золота мають сильну спорідненість до атомів сірки, що надає можливість модифікувати свою поверхню різними способами за допомогою S-вмісних сполук для діагностики, зондування та комплексної хіміотерапії [4].

Враховуючи ці дані основним завданням доставки ліків наночастками золота є розробка системи, здатної циркулювати в кровотоці непомітно для імунної системи або застосовуватися локально для тривалого вивільнення терапевтичного корисного навантаження, здатного ідентифікувати необхідну ціль і сигналізувати для ефективної та специфічної доставки [5].

На даний момент часу не вистачає довгострокових спостережень за біобезпекою *in vivo* та *in vitro* для впровадження цих інноваційних терапевтичних засобів у клінічну практику та для керівництва їх розробкою. Ера наномедицини тільки почалася. Ми сподіваємося, що в найближчому майбутньому матимемо безпечні та ефективні терапевтичні засоби на основі нанозолота.

Новизною даної роботи є:

- 1) використання зовнішньоклітинного біосинтезу (супернатант-опосередкованого) наночасток золота з використання морської бактерії *Paracoccus haeundaensis* BC74171 при невеликій тривалості (15 хв.) генерації AuNPs, яка не потребує додаткової обробки клітин, на відміну від внутрішньоклітинного синтезу (безклітинний екстракт або виділені білки);
- 2) утворені наночастинки золота може використовуватися як новітня платформа для доставки ліків в неоперабельні солідні злоякісні пухлини.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

Характеристика наночастинок золота та їх застосування

Наноматеріали — це дрібні частинки з діапазоном діаметрів 1–100 нм. У такому малому масштабі фізико-хімічні та біологічні характеристики цих матеріалів істотно відрізняються від об'ємного металу. Властивості наночастинок залежать від розміру, наприклад, менш ніж 300 атомами золота демонструють чіткі оптичні властивості. Розмір наноматеріалів забезпечує велике співвідношення площі поверхні до об'єму, що дозволяє зв'язувати велику кількість високоафінних лігандів [6].

Золото як метал вважається інертним і нетоксичним, хоча залежить від металевої маси та ступенів окиснення. З швидким розвитком нанонауки AuNP адаптовані у вигляді різних морфологій, таких як наносфери, наностержні, наноболонки, наноклетки, нанокуби та нанозірки [7].

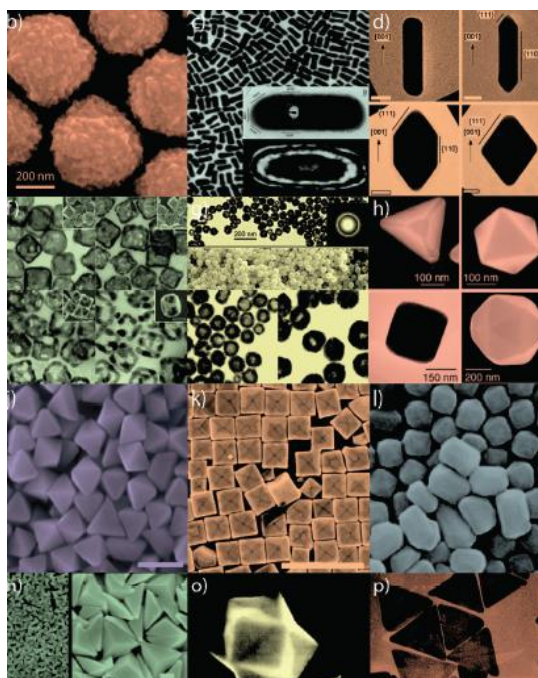


Рис.1.1 Електронні мікрофотографії різноманітних форм наночастинок золота [7]

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дзюба М.В.					9	5
Консульт.								
Керівник		Скроцька О.І.						
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков						
						Кафедра БТМ		

При низькій температурі наночастинки виглядають твердоподібними з підвищенням температури структура набуває властивості рідини. Температура плавлення наночастинок золота залежить від розміру, форми та складу. У багатьох випадках вона є нижчою за температуру плавлення масового металу. Оптичні властивості металевих наночастинок базується на колективному колюванні електронів на поверхні (резонанс з падаючим електромагнітним випромінюванням) на поверхнях, відомих як поверхневий плазмонний резонанс (SPR). У випадку золота, резонансна частота цього колективу колювання лежить у видимому діапазоні електромагнітного спектру, тому колоїдний розчин набуває від рожевого до червоно-рубінового забарвлення. Колориметричні зміни можуть дуже варіюватися через модифікацію поверхні, агрегацію наночастинок, показник заломлення в середовищі, тощо. Тому опромінення лазерним світлом наночастинок золота супроводжується розсіюванням світла з довжиною хвилі, подібною до лазерної. Це корисна властивість в використанні як контрастної речовини для біомедичної візуалізації, конфокальної скануючої оптичної мікроскопії, мікроскопії третьої гармоніки і т.п [8].

Механізми мікробного синтез наночастинок золота. Для виживання деякі мікроорганізми використовують різні механізми для усунення впливу важких токсичних металів. Вони передбачають активне відновлення іонів токсичних металів до нетоксичних іонів. Синтез наночастинок мікробами може бути внутрішньоклітинним або позаклітинним. Внутрішньоклітинний механізм полягає в транспортуванні специфічних іонів у клітинну стінку, де наявні ферменти, перетворюють токсичні метали в нетоксичні металеві наночастинки. Тоді як позаклітинний механізм включає опосередкований синтез ферментами, наприклад нітратредуктазу або гідрохінон, синтезований багатьма грибами або прокаріотичними організмами. Деякі амінокислоти, включаючи цистеїн, аспарагінову кислоту, глютамінову кислоту, аргінін, лізин і метіонін, беруть участь у біовідновленні іонних форм металу. Наразі все ще досліджуються точні механізми та знаходження основних молекул для відновлення солей золота в наночастинки [9].

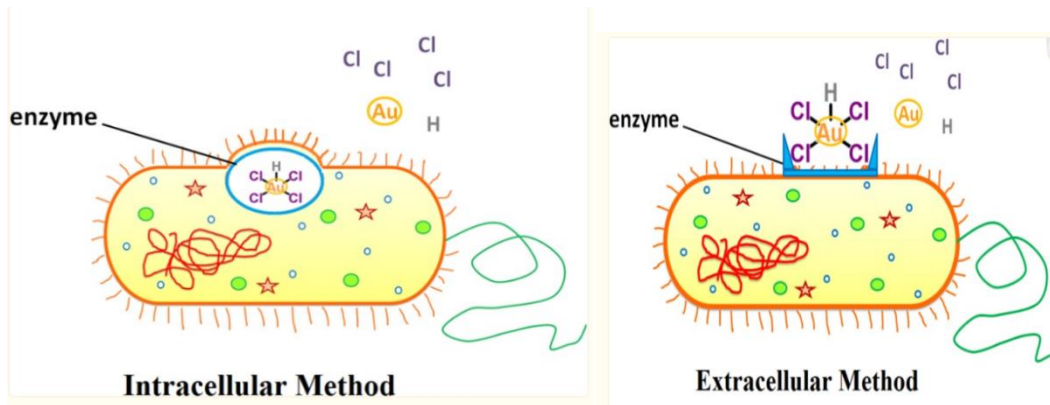


Рис.1.2 Схематичне зображення внутрішньо та зовнішньо клітинного синтезу наночастинок золотв мікроорганізмами [9]

Фототермічна (ФТТ) та фотодинамічна (ФДТ) терапія. Оптичні властивості наночастинок золота залежать від поверхневого плазмонного резонансу - це процес, за якого електрони золота резонують у відповідь на вхідне випромінювання. Крім того, деякі наночастинок золота спеціальної форми сприяють поперечному перерізу захоплення фотонів, який у чотири-п'ять разів більший, ніж у фототермічних барвників. Це дає фундамент для отримання локального нагрівання (ФТТ) і подальше руйнування ракових клітин. При ФДТ викликається апоптоз або некроз в пухлинних клітинах синглетним киснем і високоактивними вільними радикалами, що утворюються за рахунок енергії фотосенсибілізації [10].

Наночастинок золота як носії лікі. Завдяки своєму малому розміру вони можуть ефективно проходити через капіляри, щоб досягти клітин мішеней. Хіміотерапевтичні препарати можуть бути завантажені або прикріплені до наночастинок і бути націлені. Наявність негативного заряду на поверхні наночастинок золота робить їх легко модифікованими. Це означає, що їх можна легко кон'югувати з різними біомолекулами, таких як ліки, націлюючі ліганди та гени [11].

Візуалізація. Мільйони функціоналізованих наночастинок золота вводять у пухлину, де вони зв'язуються з раковими клітинами та світяться, що полегшує хірургам ідентифікацію пухлини та здорових клітин. Відомо, що наночастинок

золота (нанострижні, наноклітки та нанооболонки) є найкращими наявними наночастинками фотозображень для лікування раку завдяки їхній біоінертності та здатності забезпечувати підвищену просторову та часову роздільну здатність зображень [12].

Антибактеріальна активність. Бактеріальні білки, розташовані в цитоплазмі та в клітинній стінці, реагують з НЧ, що в кінцевому підсумку викликає загибель клітин. Золото має більшу схильність реагувати з сірковмісними білками, присутні в мембрані або всередині клітин, і фосфорвмісні молекули ДНК є кращими місцями для атаки наночастинок. Також зв'язуються з тіоловими групами, присутніми в таких ферментах, як НАДН-дегідрогенази, і порушують дихальний ланцюг, сприяючи вивільненню активних форм кисню, що призводить до окислювального стресу та призводить до значного пошкодження клітинних структур і смерті [13].

Комерційно доступні продукти на основі наночастинок золота.

Виробник	Розмір AuNPs, нм	Концентрація	Застосування
AuroVist [14]	15 та 1,9	40 мг в 0,2 мл PBS	Рентгеноконтрастний агент для (мікро)-КТ
Aurimmune [15]	27, кон'юговані з ФНП- α	-	Доставка ФНП- α до солідних пухлин
Aurion [16]	6,10,15,25 (дослідн.) 20,40 (діагностика)	-	Дослідницькі цілі. Для одноразового та багаторазового маркування в електронній мікроскопії. Діагностичні цілі.
Wantai [17]	-	-	Тест бічного потоку на SARS-CoV-2

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Наночастинки золота традиційно синтезують за допомогою хімічних та фізичних методів. Однак їх використання супроводжується рядом недоліків. Для хімічного синтезу основними недоліками є використання токсичних відновників, канцерогенних розчинників і подальше забруднення навколишнього середовища. Фізичні методи (метод лазерного опромінення) потребують дорогого обладнання та великих енерговитрат. Крім того, низька стабільність AuNP, труднощі в контролі росту кристалів і агрегації частинок роблять вищевказані методи менш вигідними [15].

Тому на сьогодні «зелений» (біологічний) синтез AuNPs привертає все більше уваги у зв'язку з використанням нетоксичних речовин без додаткових стабілізаторів і відновників, низькі енерговитрати та екологічна безпека. Велике розмаїття живих організмів дозволяє виробляти специфічні речовини, орієнтовані на біосинтез наночастинки золота. Крім того, біомолекули, які виділяються бактеріями, грибами, водоростями, рослинами та їх екстрактами, позитивно впливають як на процес синтезу, так стабілізації AuNP [16].

Під час вибору біологічного агента для синтезу наночасток золота було обрано бактеріальні продуценти, а саме *Paracoccus haeuundaensis* BC74171, *Bacillus cereus*, *Geobacillus stearothermophilus* та *Brevibacterium casei*. Технологія біосинтезу відрізнялася за використанням супернатанту, безклітинного екстракту та біомаси, тривалістю культивування та генерації

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дзюба М.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						13	7 13
Керівник		Скроцька О.І.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Стабніков					

золотих наночастинок, їх розміром та стабільністю. Розглянемо мікробних продуцентів AuNPs (табл. 3.1).

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика культивування продуцентів та технології трансформації наночастинок золота

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л		Особливості процесу культивування	Форма; розміри наночасток, нм	Параметри біосинтезу наночасток	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
<i>Paracoccus haeundaensis</i> BC74171	Marine Broth: Пептон Дріжджовий екстракт NaCl Цитрат Fe (III) MgCl ₂ CaCl ₂ KCl KBr NaF NH ₄ NO ₃ Na ₂ HPO ₄	5 1 19.45 0.1 5.9 1.8 0.55 0.08 0.0024 0.0016 0.008	Культивування у колбах на качалці 25°C, рН 8, 100 об/хв, 48 год	Сферична 15-35	Безклітинний супернатант, 2 мМ HAuCl ₄ , 70°C, 100 об/хв, 15 хв.	Patil, M. P., Kang, M. J., Niyonizigiye, I., Singh, A., Kim, J. O., Seo, Y. B., & Kim, G. D. (2019). Extracellular synthesis of gold nanoparticles using the marine bacterium <i>Paracoccus haeundaensis</i> BC74171T and evaluation of their antioxidant activity and antiproliferative effect on normal and cancer cell lines. <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , 183, 110455. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110455
<i>Bacillus cereus</i>	Nutrient Broth: Пептон Екстракт яловичини Дріжджовий екстракт NaCl	10 1 2 5 17,5 1,5	Культивування у колбах на качалці 37°C, рН 7, 150 об/хв, 24 год	Сферична, Гексагональна, октагональна 20-50	Безклітинний супернатант, 1 мМ HAuCl ₄ , 37°C, 200 об/хв, 24 год	Pourali, P., Badiiee, S. H., Manafi, S., Noorani, T., Rezaei, A., & Yahyaei, B. (2017). Biosynthesis of gold nanoparticles by two bacterial and fungal strains, <i>Bacillus cereus</i> and <i>Fusarium oxysporum</i> , and assessment and comparison of their nanotoxicity in vitro by direct and indirect assays. <i>Electronic Journal of Biotechnology</i> , 29, 86-93. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.07.005

Продовження таблиці 2.1

<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Казеїн Соевий шрот NaCl K ₂ HPO ₄ Декстроза	17 3 5 2,5 2,5	Культивування у колбах, 60°C, рН 7, 100 об/хв, 48 год	Сферична, 5-35	Безклітинний екстракт (біомаса в стерильній дистильованій воді 48 год, 27°C, 200 об/хв), 1 мМ HAuCl ₄ , 27°C, 100 об/хв, 72 год	Fayaz, A. M., Girilal, M., Rahman, M., Venkatesan, R., & Kalaichelvan, P. T. (2011). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium <i>Geobacillus stearothermophilus</i> . <i>Process Biochemistry</i> , 46(10), 1958-1962. doi:10.1016/j.procbio.2011.07.003
<i>Brevibacterium casei</i>	Екстракт яловичини Пептон NaCl	10 10 5	Культивування у колбах на качалці 28°C, 150 об/хв, 20 год	Сферичні 10-50 нм	Волога біомаса 1 г, 50 мл 1 мМ HAuCl ₄ , 37 °C , 24 год, 200 об/хв	Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., & Gurunathan, S. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using <i>Brevibacterium casei</i> . <i>Colloids and surfaces B: Biointerfaces</i> , 77(2), 257-262. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.02.007

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів для синтезу наночастинок золота

Продуценти	Компонент живильного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1-10)*
1	2	3	4	5	6
<i>Paracoccus haeuundaensis</i> BC74171	Пептон	5	1320	6,6	1
	Дріжджовий екстракт	1	4378	4,4	2
	NaCl	19,45	80	1,56	3
	MgCl ₂	5,9	58	0,34	4
	CaCl ₂	1,8	55	0,1	5
	Вартість 1 л середовища – 13				
<i>Bacillus cereus</i>	Пептон	10	1320	13,2	1
	Екстракт яловичини	1	7296	7,3	6
	Дріжджовий екстракт	2	4378	8,76	2
	NaCl	5	80	0,4	3
	Вартість 1 л середовища – 29,7				
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Казеїн	17	529	9	7
	Соевий шрот	3	17,5	0,05	8
	Декстроза	2,5	55	0,14	9
	K ₂ HPO ₄	2,5	124	0,31	10
	NaCl	5	80	0,4	3
Вартість 1 л середовища – 10					
<i>Brevibacterium casei</i>	Пептон	10	1320	13,2	1
	Екстракт яловичини	10	7296	73	6
	NaCl	5	80	0,4	3
	Вартість 1 л середовища – 86,6				

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

- 1 - <https://www.systopt.com.ua/item-pepton-fermentatyvnyi>
- 2 - <https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html>
- 3 - <https://silur.prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>
- 4 - <https://prom.ua/ua/p1659026631-kaltsij-hloristyj.html>
- 5 - <https://prom.ua/ua/p1274951694-magnij-hloristyj-klebrig.html>
- 6 - <http://lab-mir.com/>
- 7 - <https://prom.ua/ua/c2359731-protein-pure.html>
- 8 - <https://prom.ua/ua/p1400234336-soevyj-zhmyh-soevyj.html?&primelead=MC44NQ>
- 9 - <https://prom.ua/ua/p1558877179-dekstroza-monogidrat-meshok.html>
- 10 - <https://prom.ua/p1365947345-kalij-monofosfat-monokalij.html>

Виходячи з даних, наведених у таблиць 2.1 та 2.2, можна зробити висновок, що *Paracoccus haeundaensis* BC74171 є більш придатним продуцентом для синтезу наночастинок золота, зважаючи на короткий проміжок генерації наночастинок 15 хв при 70°C, їх переважаючу форму (сферична підходить для створення платформи для доставки ліків) і розмір. За показником часу синтезу *Bacillus cereus* і *Brevibacterium casei* у 96 рази більше, *Geobacillus stearothermophilus* – у 288 рази. Потрібно зазначити легкість супернатант-опосередкованої технології синтезу наночастинок, порівнюючи з отриманням безклітинного екстракту, яке включає в себе використання ультразвукового диспергатора, що ускладнює технологію (подальше центрифугування для видалення клітинних компонентів) і це є економічно не вигідно. *Bacillus cereus* є патогенним і спороутворюючим мікроорганізмом, та *Brevibacterium casei* - умовно-патогенна бактерія, це призводить до збільшення вимог санітарної підготовки, наприклад, високі концентрації дезінфікуючих розчинів, ускладнення методів та засобів знешкодження рідких, газоподібних та твердих відходів, спеціальне навчання персоналу поводження з патогенами, вимоги до приміщень; все це є економічно не доцільним. Культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 відбувається при 25°C, що дозволяє не підігрівати ферментер, а *Geobacillus stearothermophilus* – температура становить 60°C, *Bacillus cereus* – 37°C. Щодо вартості 1 л поживних середовищ то найдешевше у *Geobacillus stearothermophilus* і у *Paracoccus haeundaensis*, у *Brevibacterium casei* дорожче в 8,7 разів, *Bacillus cereus* – в 3. Також потрібно враховувати найбільшу концентрацію солі натрію хлориду в *Paracoccus haeundaensis* (помірний галофіл), що звужує спектр потенційно контамінуючих мікроорганізмів.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Paracoccus haeundaensis*

Бактерія є аеробною, нерухомою, грамнегативною, оранжево-пігментованою за рахунок вироблення астаксантину, паличкоподібна морська бактерія. Була виділена з узбережжя Хеунде, Корея [20] .

Фізіолого-біохімічні ознаки. Оксидазо- та каталазопозитивна. Оптимальна температура росту 25–30 °С. Оптимальна концентрація NaCl для росту 1–6 %. Оптимальний рН 8. Глюкоза не ферментується. Для росту можна використовувати такі джерела вуглецю та енергії: D-арабіноза та галактоза. Не відбувається зростання на лактозі, мальтозі, сахарозі, трегалозі, D-манітолі, D-сорбіт, інозит, D-рафіноза, d-фруктоза, D-маноза, диметилформаїд, L-глутамінова кислота, ацетон, L-лейцин, L-аспарагін, L-рамноза, саліцин, D-целобіоза, адонітол, дульцитол, D-ксилоза або гліцерин. L-орнітин і L-лізиндекарбоксилази та аргініндигідролази не виявлені. Тест на використання цитрату позитивний. Крохмаль гідролізується. З триптофану не виробляється індол. Уреазонегативна. Денітрифікація не відбувається [20].

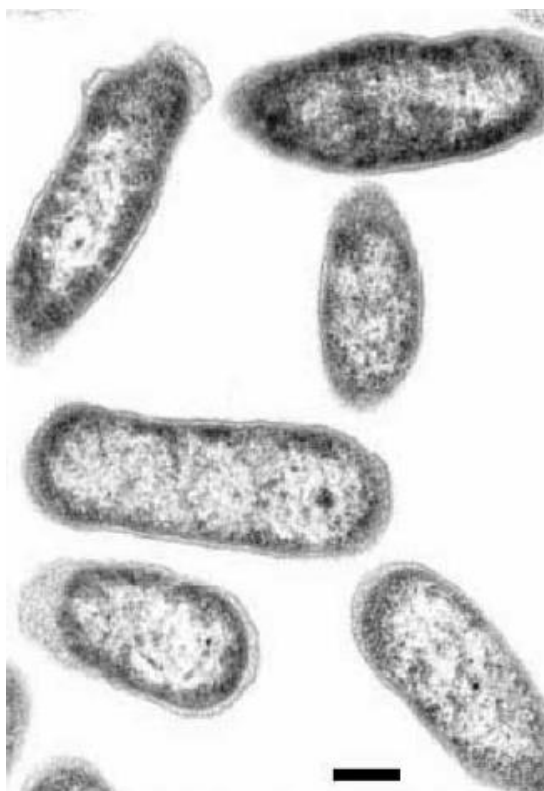


Рис. 2.1. Електронна мікрофотографія *Paracoccus haeundaensis* [20]

Культуральні ознаки. Щільна пігментація з помаранчевим кольором колонії на твердому середовищі SWC через п'ять днів інкубація при 27°C. Колонії округлої форми, лопатовий край, опукле піднесення, помірний розмір, мукоїдна текстура [20].

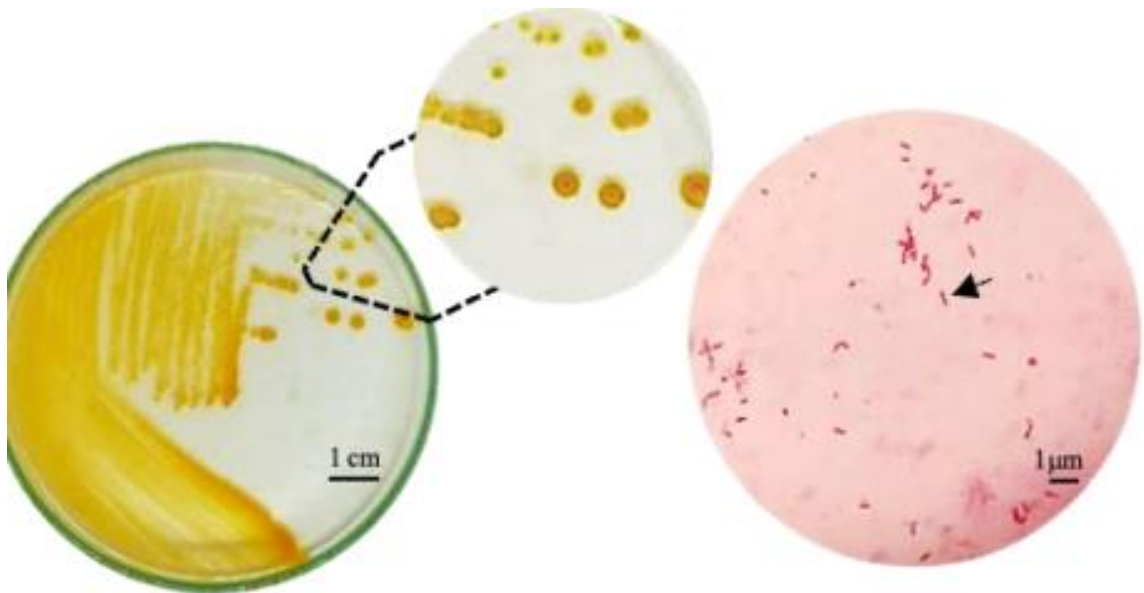


Рис.2.2. Морфолого-культуральні ознаки *Paracoccus haeundaensis* [20]

2.3. Таксономічний статус *Paracoccus haeundaensis*

Філогенетичну класифікацію для наведено відповідно до даних, зазначених у базі даних World register of marine species [22].

Домен – *Bacteria*

Царство – *Prokaryota*

Тип (Phylum) - *Proteobacteria*

Клас – *Alphaproteobacteria*

Порядок - *Rhodobacterales*

Родина – *Rhodobacteraceae*

Рід – *Paracoccus*

Вид – *Paracoccus haeundaensis*

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Передумови виробництва ліків для боротьби з раком

За уточненими даними, зібраними Національним канцер-реєстром України впродовж 2020-2021 років, в 2020 р. в Україні було зареєстровано 113 368 нових випадків захворювання на рак (54 147 у чоловіків і 59221 у жінок) та 55 941 померлих (31 177 чоловіків і 24 764 жінок). У чоловіків превалювали смерті від раку легень, простати, шлунка, колоректальних раків, і т.д. Жінки найчастіше помирали від раку грудної залози, шийки та тіла матки, яєчника, підшлункової залози і т.д. На жаль, ця статистика росте, зважаючи на все більш несприятливі фактори навколишнього середовища, відсутність обізнаності проходження чек-апу здоров'я один раз та частіше на рік, особливо для людей, які мають великі ризики новоутворень, також складність діагностики, дорогі хіміотерапевтичні препарати [6].

3.2. Фармакологічні особливості наночасток золота

Відомо, що сучасне лікування раку базується на хіміотерапевтичних препаратах, включає хіміо- або променеви терапію з метою знищення злоякісних клітин. Однак ці методи терапії часто призводять до багатьох побічних ефектів та високу токсичність через пошкодження навколишніх здорових тканин. Крім того, довготривала діагностика та висока частота рецидивів призводять до нижчого рівня виживання. Я хочу запропонувати лікування ракових клітин за допомогою підходу доставки ліків на основі наночастинок золота (AuNP), що мають ряд цінних властивостей:

- розмір ядер 1-100 нм (ефект посиленого проникнення та утримання в тканині пухлин, так як судини мають проміжки з розміром 200-400 нм);

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Дзюба М.В.					Лім.	Арк.	Акрушіє	
Консульт.								20	7	20
Керівник		Скροцька О.І.					Кафедра БТМ			
Н. Контр.										
Зав.каф.		Стабніков								

- наявність негативного заряду на поверхні, що робить їх легко модифікованими. Це означає, що їх можна легко функціоналізувати шляхом додавання різних біомолекул, таких як ліки, ліганди та гени.
- біосумісність і не токсичність [7].

3.3. Лікарський засіб на основі наночастинок золота

Незважаючи на великі перспективи наноматеріалів в ефективній терапії та діагностики раку, дуже мало проводяться дослідження *in vivo* та на ринку ще відсутні препарати на основі наночастинок золота. Але вперше в США організація з управління продовольства та медикаментів (Food and Drug Administration, FDA) дозволило передовим компаніям Astra Zeneca у співпраці з Cytoimmune провести клінічні випробування, які зосереджені на системне лікування неоперабельних солідних пухлин за допомогою AuNP, а саме препарат CYT-6091 Aurimmune. Електронні мікрофотографії біопсії тканин як здорової, так і малігнізованої, які були зроблені через 24 години після інфузії, показали, що наночастинки накопичувалися в пухлині, а не в нормальній, що свідчить про бажаний диференціальний розподіл, і як наслідок, збільшує чутливість онкопухлини до подальших хіміотерапевтичних препаратів [8].

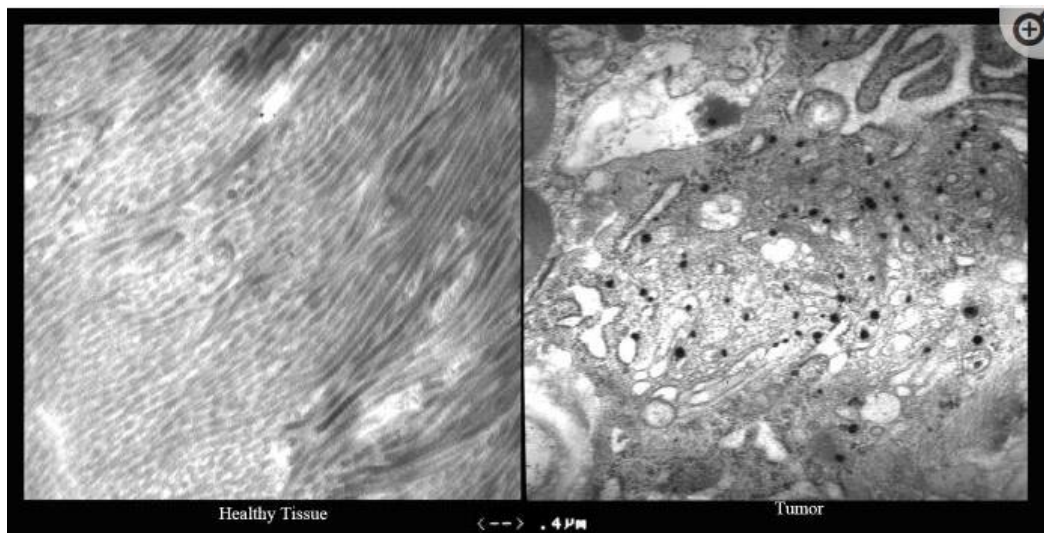


Рис. 3.1. Мікрофотографії біопсії здорової тканини та раку молочної залози (вибіркове зосередження наночастинок) [25]

Так як їх перша фаза клінічних випробувань успішно завершилася, наразі триває другий етап. Aurimmune (CYT-6091) має на меті використовуватися як

транспортний засіб для доставки рекомбінантного фактора некрозу пухлин людини альфа (rhTNF) у пухлини, що порушує кровоносні судини. Це дозволяє іншим хіміотерапевтичним препаратам проникати в пухлину та її пошкоджувати. Незважаючи на те, що фактор некрозу пухлин-альфа викликає велику кількість токсичних ефектів на здорові клітини (пошкодження ендотеліоцитів, гіпотензія, лихоманка), що до сьогодні обмежувало його повноцінне використання в медицині, спостерігали безпечну доставку вискоєфективних доз rhTNF до пухлинних клітин. А саме після іммобілізації цитокіну на пегільовані наночастки золота. Шар поліетиленгліколю також зменшив поглинання наночастинок мононуклеарною фагоцитарною системою і сприяв їх накопиченню мікрооточенні пухлини [9].

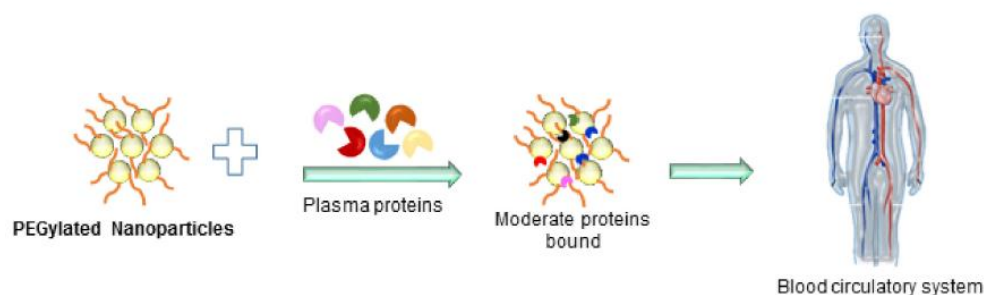


Рис.3.2. Пегільовані AuNP вільно транспортуються по кровообігу [7]

3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського препарату на основі наночастинок золота.

Як вже зазначалося, що існує велика надія випуску препаратів на основі наночасток золота, які зокрема будуть цитотоксичні до багатьох видів солідних пухлин, наприклад Aurimune (CYT-6091), зважаючи на загальні особливості побудови судинної сітки новоутворень. Тому лікування ракових клітин за допомогою підходу доставки ліків на основі наночастинок золота (AuNP) відіграє ключову роль у подоланні обмежень звичайних протоколів лікування та збільшення шансіввилікування і зменшення рецидивів.

На ринку України наявні хіміотерапевтичні препарати, але враховуючи, що поки немає на ринку препарат на основі наночастинок золота та складність включення таких ліків до протоколів лікування, пропонується забезпечити цим лікарським препаратом 2,5 % хворих. Встановлено, найбільш ефективною і переносимою дозою препарату для людини СУТ-6091 на основі золотих наночастинок була 600 мкг/м^2 (1032 мкг на 70 кг людини) при інфузійному введенні. Курс гіпотетичного лікування 2 дні (перший та п'ятнадцятий день), тобто в середньому 2064 мкг на 70 кг за 1 курс. Отже, необхідно виробляти таку кількість субстанції [8]:

$$G = \frac{113\,368 * 2064 \text{ мкг} * 2,5}{100} \approx 5,85 \text{ г наночастинок золота}$$

3.5. Розрахунок місячної потужності отримання наночастинок золота, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.

Для подальших розрахунків необхідно врахувати наступні дані:

- 1) Для трансформації наночастинок золота з солі тетрахлораурат водню використовують супернатант *Paracoccus haendaensis* BC 74171. Під час центрифугування 1 л культуальної рідини виникають втрати, тому отримуємо 930-950 мл супернатанту.
- 2) Використовується 1 мМ тетрахлораурата (HAuCl_4), що дорівнює $0,197 \text{ г}$ золота, на $0,93 \text{ л}$ супернатанту. Отже, для отримання $5,85 \text{ г}$ необхідно $29,7 \text{ мМ HAuCl}_4$
- 3) Нехай не повністю відновлюється золото із солі, а буде становити 30 %. Тобто, з $0,197 \text{ г}$ відновиться $0,0591 \text{ г}$ золота. Отже, для отримання $5,85 \text{ г}$ наночастинок золота потрібно взяти 99 мМ HAuCl_4 .

Отже, кількість супернатанту, для отримання $5,85 \text{ г}$ наночастинок становить:

1 мМ – $0,95 \text{ л}$

99 мМ- $x \text{ л}$

$$x = 47 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати при виділенні 20%, необхідно отримувати таку кількість супернатанту:

$$V_{кр} = \frac{47}{1 - (0,1 + 0,1)} = 59 \text{ л}$$

Для отримання 59 л супернатанту потрібно 62 л культуральної рідини.

З метою забезпечення 2,5 % населення України наночастинками золота для лікування солідних пухлин необхідно отримати 62 л культуральної рідини.

Прийmemo кількість робочих днів $T_{рд} = 30$, тоді розрахуємо кількість культуральної рідин на одну добу:

$$V_{д} = \frac{V_{гп}}{T_{рд}} = \frac{62}{30} = 2 \text{ л}$$

Кількість культуральної рідини за один цикл ($V_{кр}$) є:

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times V_{д} \times T_{цф}}{24} = \frac{1,1 \times 2 \times 56}{24} = 5,2 \text{ л/цикл,}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних процесів ($K_1 = 1,1$); $T_{цф}$ – цикл роботи біореактора, який враховує тривалість культивування (48 год) та тривалість підготовки його до роботи (8 год). Кількість циклів ферментації складатиме:

$$N_{цк} = \frac{V_{гп}}{V_{кр}} = \frac{62}{5,2} = 11,9 \approx 12 \text{ циклів}$$

3.6. Розрахунок кількості стадій підготовки інокуляту.

Для того, щоб отримати за один цикл $V_{кр} = 5,2$ л культуральної рідини враховується її втрати внаслідок краплиносу через колектор відпрацьованого повітря в біореакторі, які зазвичай є 10%.

Тоді об'єм живильного середовища та стартової культури перед культивуванням у біореакторі становить:

$$V_{роб} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 5,2 / (1 - 0,1) = 5,8 \text{ л}$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу

Коефіцієнт заповнення реактору ($K_{\text{зап}} = 0,6$) при культивування аеробних організмів, тоді його геометричний об'єм (V_{ϕ}):

$$V_{\phi} = V_{\text{роб}} / K_{\text{зап}} = 5,8 / 0,6 = 9,7 \text{ л}$$

Стандартний ферментер повинен мати об'єм щонайменше: $V_{\text{сф}} = 10$ л та уточнимо, прийнятий нами раніше, коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб}} / V_{\text{сф}} = 5,8 / 10 = 0,58$$

Отже, коефіцієнт наповнення біореактора перебуває у вибраних межах (0,5-0,7) для культивування аеробів, тому можемо встановлювати його на виробництво.

Кількість стартової культури для ферментатора буде становити 10% від об'єму самого живильного середовища. Отже, кількість середовища для культивування в біореакторі розраховується за формулою:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{роб}} / (1 + X_{\text{вф}}) = 5,8 / (1 + 0,1) = 5 \text{ л}$$

де $X_{\text{вф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді кількість інокуляту розраховується різницею між культуральною рідиною і живильним середовищем:

$$V_{\text{пм}} = V_{\text{роб}} - V_{\text{пс}} = 5,8 - 5 = 0,8 \text{ л}$$

Враховуючи малий об'єм стартової культури, використовуються качалочки колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл з коефіцієнтом наповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість качалочних колб для отримання стартової культури розраховується (не враховується коефіцієнт краплевиносу):

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 800 / (750 \times 0,2) \approx 6 \text{ качалочних колб}$$

Отже, процес отримання стартової культури для подальшого внесення в біореактор буде проходити в одну стадію:

1 – стерильне вирощування в лабораторії (пересів музейної культури на скошене агаризоване середовище з РРЕS-II в пробірках і подальше вирощування на рідкому живильному середовищі на качалочній колбі протягом 18 год);

2 – Культивування в біореакторі об'ємом $0,01 \text{ м}^3$ (10л).

**Узагальнюючі дані об'ємів живильних середовищ та апаратів для
вирощування стартової культури і ферментації**

№ стадії	Потрібний об'єм культуральної рідини, $V_{кр}$, л	Об'єм культуральної рідини з врахуванням втрат, $V_{роб}$, л	Об'єм стартової культури, $V_{пм}$, л	Об'єм живильного середовища, $V_{пс}$, л	Коефіцієнт наповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера або кількість качалочних колб, $V_{ст}$, л
1	5,2	5,8	0,8	5	0,5	10
2	-	-	0,8	0,8	0,2	6 колб

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ *Paracoccus haendaensis*

4.1. Шляхи катаболізму глюкози у *Paracoccus haendaensis*

Paracoccus haendaensis BC 74171 може використовувати як ростовий субстрат глюкозу для побудови біомаси і отримання енергії. На жаль, у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes схему катаболізму глюкози у *Paracoccus haendaensis* BC 74171 не наведено, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо філогенетично спорідненого організму – *Paracoccus marcusii* [20].

Шлях катаболізму вуглеводу глюкози відбувається за принципом гліколізу, який представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Глюкоза активується в глюкозо-6-фосфат за участі ферменту гексокінази (КФ.2.7.1.1), яка в свою чергу під дією глюкозо-6-фосфатізомераз (КФ.5.3.1.9) перетворюється на фруктозо-6-фосфат. За участі 6-фосфофруктокінази (КФ.2.7.1.11) відбувається приєднання фосфатної групи до фруктозо-6-фосфату з утворенням фруктозо-1,6-дифосфат. Фруктозодифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13) каталізує утворення двох інтермедіатів: дигідроксиацетонфосфату і гліцеральдегід-3-фосфату з фруктозо-1,6-дифосфату. Дигідроксиацетонфосфат під дією ферменту триозофосфатізомераз (КФ. 5.3.1.1) перетворюється у гліцеральдегід-3-фосфат, потім метаболізується у 1,3-дифосфогліцерат за допомогою ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12). Далі 1,3-дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат, із якого утворюється 2-фосфогліцерат за допомогою 2,3-дифосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази (КФ.5.4.2.11). Енолаза (4.2.1.11) каталізує перетворення 2-фосфогліцерату на фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією гліколізу є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією ферменту піруваткінази (КФ.2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗНУХТ БТЕК		
Змн.	Арк.А	№ докум.№	Підпис	Дата			
Розроб.		Дзюба М.В.			Літ.Літ	Арк.Арк.	АкрушівАкру
Консульт.						277	82 27
Керівник		Скроцька			Кафедра БТМКафедра		
Н. Контр.							
Зав.каф.		Стабніков					

Схема катаболізму глюкози у *Paracoccus haendaensis* наведено на рис.4.1.

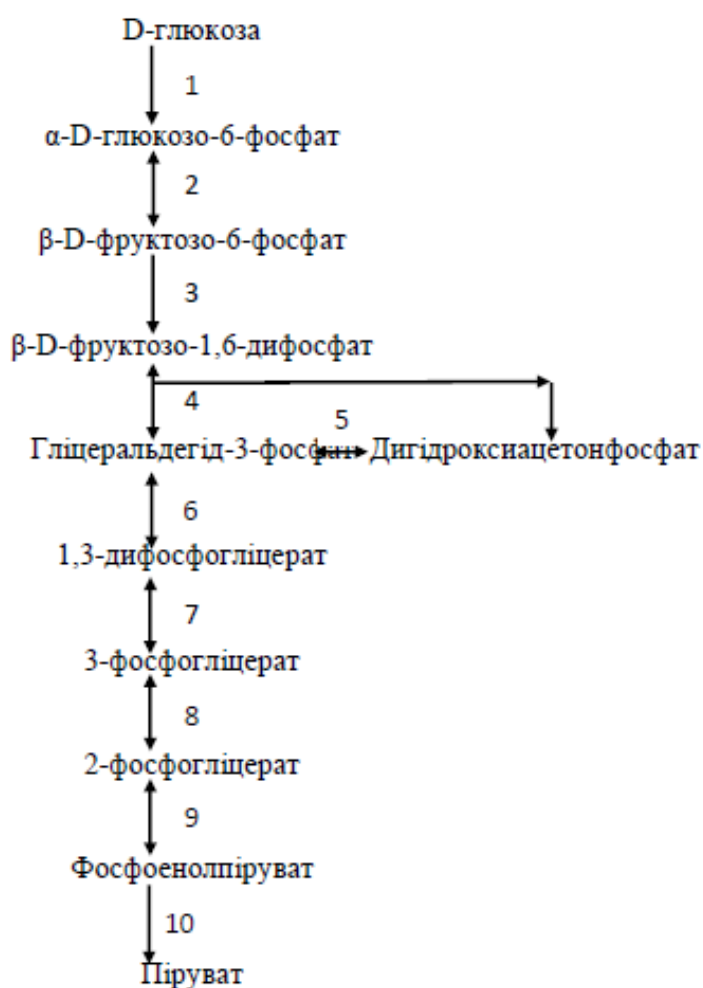


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози у *Paracoccus haendaensis*.

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфотруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозо-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-дифосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація глюкози в біомасу *Paracoccus haendaensis*

Для отримання наночастинок золота використовують «зелений синтез», тобто під час культивування мікроорганізмів утворюються та виділяються метаболіти, які відновлюють сіль тетрахлораурат водню до наночастинок, водночас стабілізуючи їх

форму та розмір. Припускаємо, що ці метаболіти можуть бути складовою біомаси: ферменти, амінокислоти, полісахариди, та інші. Тому доцільно розглянути біотрансформацію ростового субстрату (глюкоза) у складові біомаси (нуклеїнові кислоти, ліпіди, білки, полісахариди клітинної стінки).

Під час накопичення біомаси *Paracoccus haendaensis* BC 74171 використовує глюкозу як джерело вуглецю та енергії, катаболізується шляхом гліколізу до утворення пірувату, який далі в ацетил-КоА під дією піруватдегідрогеназного комплексу ферментів такі як піруватдегідрогенази K1 компонента (КФ 1.2.4.1) та піруватдегідрогенази K2 компонента (КФ 2.3.1.12), ацетил-КоА далі надходить до циклу Кребса. За допомогою ферменту цитратсинтази (КФ 2.3.3.1) ацетил-КоА та оксалоацетат, який утворюється за допомогою ферменту піруваткарбоксілаза (КФ 6.4.1.1), перетворюються в цитрат, який в подальшому перетворюється в ізоцитрат за дією ферменту аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3). Ізоцитрат перетворюється за допомогою ферменту ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42) на 2-оксоглутарат, який під дією ферментів 2-оксоглутаратдегідрогенази K1 компонента (КФ 1.2.4.2), 2-оксоглутаратдегідрогенази K2 компонента (КФ 2.3.1.61) та бета-субодиниці сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.4) перетворюється в сукцинат. Фермент сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1) каталізує трансформацію сукцинату фумарату до малату під дією фумаратгідратази (КФ 4.2.1.2). Малат за допомогою малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) трансформується в оксалоацетат.

Анаплеротичними реакціями на рості вуглеводних ростових субстратів є: карбоксилювання пірувату до утворення оксалоацетату під дією піруваткарбоксілази (КФ 6.4.1.1), трансформація фосфоенолпірувату в оксалоацетат за допомогою фосфоенолпіруваткарбоксікінази (АТФ) (КФ 4.1.1.49), та утворення малату з пірувату під дією оксалоацетат-декарбоксилювальна малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.38).

Синтез ліпідів. Інтермедіат гліколізу, дигідроксиацетонфосфат, який утворений з гліцеральдегід-3-фосфату під дією триозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1), є стартовою точкою для синтезу тригліцеридів. За допомогою ферменту дигідроксиацетонфосфатацилтрансферази (КФ 2.3.1.42) дигідроксиацетонфосфат

трансформується в ацилгліцеролфосфат. Далі у під дією ферменту ацилгліцеронфосфатредуктази (КФ 1.1.1.101) перетворює його у лізофосфатидат. Лізофосфатидат перетворюється у фосфатидат за допомогою каталізу ферменту лізофосфатидатацилтрансферази (КФ 2.3.1.51). Під дією ферменту фосфатидатфосфатаза (КФ 3.1.3.4) відбувається перетворення фосфатидату у 1,2-діацилгліцерин. Остаточо потім утворюється тригліцерид за допомогою ферменту фосфоліпід:діацилгліцеролацилтрансфераза (КФ 2.3.1.158).

Іншою важливою складовою ліпідів є жирні кислоти, що приєднуються до тригліцеридів, синтезуються шляхом утворення затравки ацетил-АПБ з ацетил-КоА під дією бета-субодиниці синтази жирних кислот (КФ 2.3.1.86). Друга важливий компонент є малоніл-АПБ, який утворюється з малоніл-КоА за допомогою ферменту S-малонілтрансферази (КФ 2.3.1.39). Малоніл-КоА в свою чергу бере початок з ацетил-КоА під дією ацетил-КоА карбоксилази (КФ 6.4.1.2).

Амінокислоти. Білки. Для синтезу триптофанової родини амінокислот (триптофан, фенілаланін, тирозин) та гістидину використовується інтермедіат гліколізу - фосфоенолпіруват, та пентозофосфатного циклу -- еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Фосфоглюконатний шлях (окислювальний пентозофосфатний шлях) бере початок із реакції перетворення α -D-глюкозо-6-фосфат у β -D-глюкозо-6-фосфат під дією глюकोзо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9). β -D-глюкозо-6-фосфат під дією глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогенази (КФ 1.1.1.49) трансформується у D-глюконо-1,5-лактон-6-фосфат, останній каталізуються до D-глюконат-6-фосфату за допомогою ферменту 6-фосфоглюконолактонази (КФ 3.1.1.31). Потім перетворюється у пентозу рибулозо-5-фосфату під дією глюконат-6-фосфатдегідрогенази. В ряді біохімічних реакцій отримується еритрозо-4-фосфат необхідний для побудови триптофану та фенілаланіну.

Амінокислоти глутаматної родини беруть початок з інтермедіату циклу Кребса 2-оксоглутарату. За допомогою ферменту аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1) 2-оксоглутарату перетворюється у глутамат. Останній трансформується у N-ацетилглутамат під дією ацетил-КоА: L-глутамат-N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.1). N-ацетилглутамат приєднує фосфатну групу до утворення N-

ацетилглутаматфосфат за допомогою ацетилглутаматкінази (КФ 2.7.2.8), потім перетворюється в N-ацетоглутаматсеміальдегід. В подальшому перетворюється на ацетилорнітин, який входить в орнітиновий цикл, з якого можна отримати аргінін. З глутамату утворюється пролін завдяки ряду біохімічних перетворень. Також з глутамату під дією ферментів глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) та глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) отримується глутамін.

Попередником валіну, лейцину, аланіну та лізину (через діамінопімелінову кислоту) є інтермедіат циклу лимонної кислоти - піруват. Серин утворюється з 3-фосфогліцерату, та також з першого в ряді біохімічних реакцій синтезуються цистеїн та гліцин.

Попередником амінокислот аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін та ізолейцин). є оксалоацетат.

Нуклеїнові кислоти. Пиримідинові та пуринові нуклеотиди. Відправною точкою синтезу піримідинових нуклеотидів є реакція між карбоаміоїлфосфатом та аспартату, що каталізується ферментом аспартаткарбоаміоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2) до утворення N-карбоаміоїл-L-аспартату. Карбоаміоїлфосфат у свою чергу бере початок з реакції приєднання аміаку, карбону діоксиду та 2-х молекул АТФ за участю карбоаміоїлфосфатсинтази (КФ 6.3.5.5). Карбоаміоїласпартат перетворюється у дигідрооротат під дією ферменту дигідрооротази (КФ 3.5.2.3). Потім трансформується в оротат за допомогою дигідрооротатдегідрогенази (КФ 1.3.98.1). Оротат приєднується до 5-фосфорибозил-1-пірофосфатом, попередником якого є рибозо-5-фосфат, завдяки оротатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10) до утворення оротидин-5-фосфату. Оротидин-5-фосфатдекарбоксилази (КФ 4.1.1.23) каталізує перетворення оротидин-5-фосфату в уридинмонофосфат. До останнього приєднується фосфатна група до утворення уридиндифосфату за допомогою аденілаткінази (КФ 2.7.4.14). Знову приєднується фосфатна група до утворення уридинтрифосфату під дією нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6). Уридиндифосфат трансформується в цитидинтрифосфат за допомогою цитозинтрифосфат-синтази (КФ 6.3.4.2).

Синтез пуринових нуклеотидів стартує з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, який перетворюється у 5-фосфорибозиламін завдяки амідфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.14). 5-фосфорибозиламін після ряду послідовних реакцій утворює проміжну сполуку інозинмонофосфат, який паралельно перетворюється на 2 різні сполуки: на ксантозин-5-фосфат під дією ІМФ дегідрогенази (КФ 1.1.1.205) і на аденілосукцинат під дією аденілосукцинатсинтази (КФ 6.3.4.4). До аденілосукцинату приєднується фосфатна група до утворення аденозин-5-фосфат за допомогою аденілосукцинатліази (КФ 4.3.2.2), а ксантозин-5-фосфат трансформується в гуанозинмонофосфат під дією гуанозинмонофосфат-синтази (КФ 6.3.5.2). Далі до аденозин-5-фосфат приєднується фосфатна група до утворення аденозин-5-дифосфат під дією аденілаткінази (КФ 2.7.4.3), а гуанозинмонофосфат також приєднує фосфат до подальшого утворення гуанозиндифосфат під дією гуанілаткінази (КФ 2.7.4.8). До утворення кінцевих пуринових нуклеотидів АТФ і ГТФ залучається фермент нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6)

Клітинна стінка. Ліпополісахарид. Так як бактерія є грам негативною, тоді до складу клітинної стінки входять полісахариди, які беруть початок з глюкозо-6-фосфат і фруктозо-6-фосфат. Після біохімічних послідовних реакцій зшиваються у вигляді глюкозамін-6-фосфату і УДФ-глюкози.

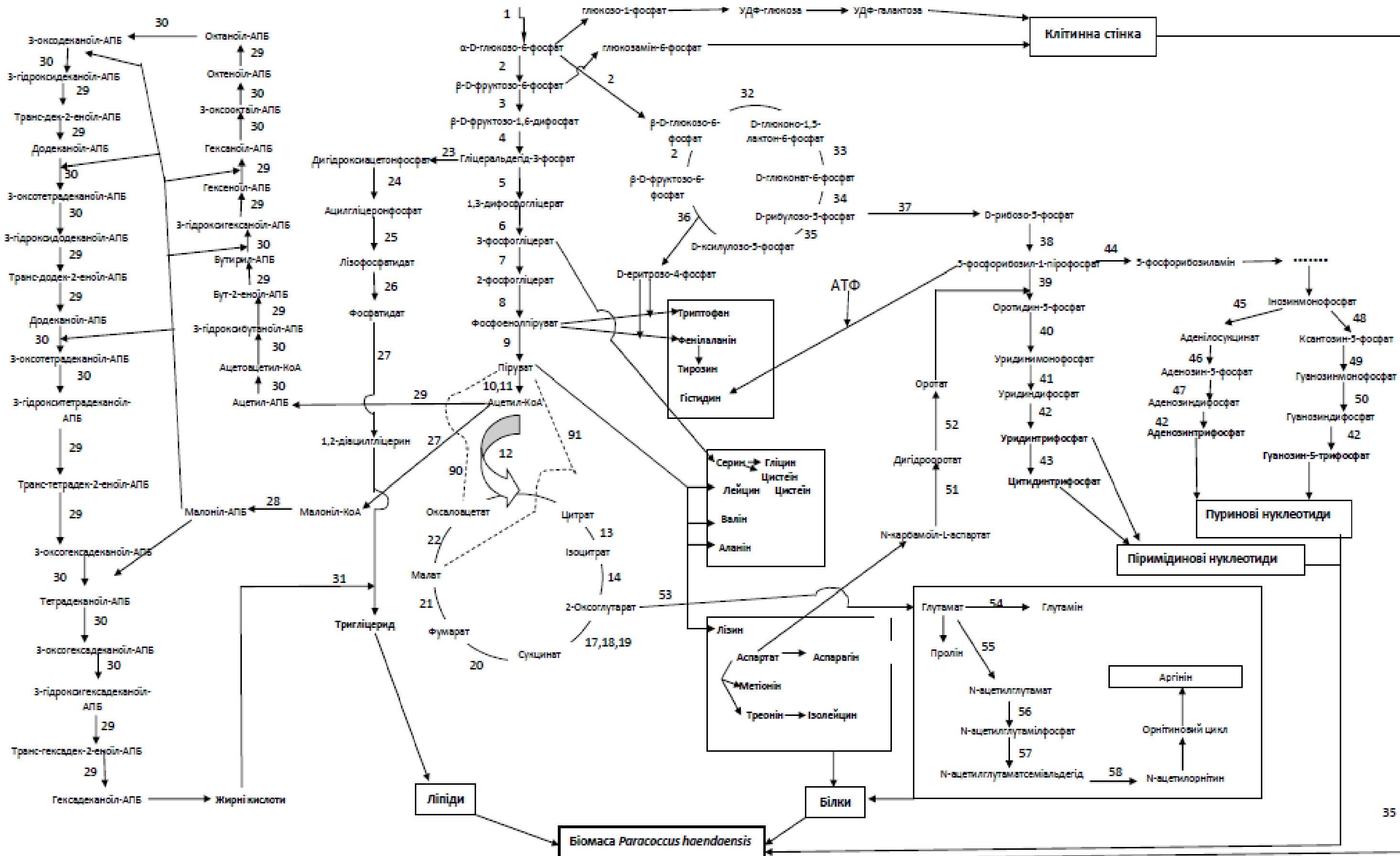
Умовні позначення: \longrightarrow - основний шлях синтезу біомаси
 \dashrightarrow - анаплеротичні реакції

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозо-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 6 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 7 – 2,3-дифосфогліцерат-залежна

фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 8 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 9 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 10 – піруватдегідрогеназа К1 компонент (КФ 1.2.4.1); 11 – піруватдегідрогеназа К2 компонент (КФ 2.3.1.12); 12 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 – 90 – піруваткарбоксілаза (КФ 6.4.1.1); 14 – 91 – оксалоацетатдекарбоксілювальна малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.38); 15 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 16 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 17 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа К1 компонент (КФ 1.2.4.2); 18 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа К2 компонент (КФ 2.3.1.61); 19 – бета-субодиниця сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.4); 20 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 21 – фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2); 22 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 23 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 24 – дигідроксиацетонфосфатацилтрансфераза (КФ 2.3.1.42); 25 – ацилгліцеронфосфатредуктаза (КФ 1.1.1.101); 26 – лізофосфатидатацилтрансфераза (КФ 2.3.1.51); 27 – фосфатидатфосфатаза (КФ 3.1.3.4); 28 – [ацил переносний білок] S-малонілтрансфераза (КФ 2.3.1.39); 29 – бета-субодиниця синтази жирних кислот (КФ 2.3.1.86); 30 – альфа-субодиниця синтази жирних кислот (КФ 2.3.1.86); 31 – фосфоліпід: діацилгліцеролацилтрансфераза (КФ 2.3.1.158); 32- глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49); 33 – 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31); 34 – 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44); 35 – рибулозофосфат-3-епімераза (КФ 5.1.3.1); 36 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 37 – рибозо-5-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.6); 38 рибозофосфатпірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 39 – оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10); 40 – оротидин-5-фосфатдекарбоксілаза (КФ 4.1.1.23); 41 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.14); 42 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 43 – ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 44 амідифосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14); 45 – аденілосукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.4); 46 – 1,3-β-глюкансинтаза (КФ 2.4.1.34); 47 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 48 – ІМФ дегідрогеназа (КФ 1.1.1.205); 49 – ГМФ-синтаза (КФ 6.3.5.2); 50 – гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8); 51 – дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3); 52 – дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.98.1); 53 аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 54 – глютамінсинтетаза (КФ 6.3.1.2); 55 – ацетил-КоА: L-глютамат-N-

ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.1); 56 – ацетилглутаматкіназа (КФ 2.7.2.8); 57 - N-ацетил-гамма-глутаміл-фосфатредуктаза (КФ 1.2.1.38); 58 – ацетилорнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11).

Біотрансформація глюкози у біомасу *Paracoccus haendaensis*



РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА СИНТЕЗУ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та культивування *Paracoccus haendaensis*

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Культивується штамм *Paracoccus haeundaensis* BC74171 при температурі 25 °С і оптимальне рН рівне 8. Тому існує ризик контамінації аеробними мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами, які є повсюди. З цього слідує, що потрібно передбачити асептичні умови під час ферментації, а саме стерилізація обладнання, компонентів поживного середовища, повітря для аерації [27].

Культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 з вище згаданих причин здійснюють тільки глибинним способом. Беручи до уваги, що синтез наночастинок золота відбувається за допомогою утворених метаболітів (білки, амінокислоти, полісахариди), які наявні в супернатанті (виділяються під час стаціонарної фази), є доцільно проводити періодичний процес культивування.

Отже, при культивуванні *Paracoccus haeundaensis* BC74171 проводиться глибинний спосіб ферментації в аеробних умовах із забезпеченням асептики.

Зважаючи на умови та способи культивування *Paracoccus haeundaensis*, а також його культуральні та фізіолого-біохімічні особливості обираються елементи конструкції ферментера, які створять належні умови для ферментації.

1. *Paracoccus haeundaensis* є облігатним аеробом, тобто потрібно забезпечити подачу стисненого аеруючого повітря під час культивування. Тому необхідно встановити барботер, датчик розчиненого кисню, газоаналізатор для контролю концентрації утвореного під час ферментації діоксиду вуглецю.

2. Для збільшення поверхні контакту фаз задля розчинення кисню в культуральній рідині, досягти рівномірного розподілу біомаси і поживних компонентів встановлюється перемішувач з частотою обертів від 100 об/хв. Зважаючи, на морфолого-культуральні ознаки продуцента,

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дзюба М.В.			Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.						36	22 36
Керівник		Скроцька О.І.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав.каф.		Стабніков					

а саме те що він не утворює гіфів та міцелій, можна обрати турбінну або лопатеву мішалку.

3. Щоб утримувати постійний показник рН=8, потрібен датчик рН та автоматична подача титруючих розчинів (розчин їдкого натру та хлоридна кислота).

4. Незважаючи на те, що біологічний агент культивується при кімнатній температурі (25°C) та можна не підтримувати сорочкою температуру, все ж таки встановлюємо її та температурний датчик для контролю стерилізації біореактора і його комунікацій. Також ферментер повинен бути герметичним і витримувати досить високі тиски під час стерилізації.

Такі промислові ферментери об'ємом 10 л випускає фірма «Lab1ST» (США). Біореактори виготовлені зі нержавіючої сталі SS304 & SS316L, можна проводити: стерилізацію на місці (SIP), тому що оснащений паропроводом високої температури, наявні стандартні сенсорні порти для точного вимірювання та контролю температури, рН, розчиненого кисню, аерації та тиску. Оснащений сорочкою, що дозволяє регулювати температуру за допомогою гарячої води та охолоджувача. Є барботер, перемішувачий пристрій з частотою обертів 5-1000об/хв., аерація відбувається в різних режимах: 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10 л/хв.; в комплекті йде фільтр для аеруючого повітря 0,2 мкм, витримує тиск 0,3МПа [28].

Отже, для проведення культивування *Paracoccus haeundaensis* необхідно створювати асептичні умови, періодичним глибинним способом, подача титруючих розчинів для становлення рН, перемішувачий пристрій передбачивши наявність перемішувачого пристрою та барботер для подачі кисню в культуральну рідину.

5.1.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Продуцент *Paracoccus haeundaensis* BC74171 є аеробом, тому необхідно забезпечити при його культивуванні безперервну подачу стисненого стерильного аераційного повітря через барботер. Також необхідно підвести стерильне стиснене повітря для створення надлишкового тиску (запобігання контамінації) в виробничому реакторі, де проходить реакція утворення наночасток золота.

Для забезпечення стерильності при посіві музейних культур *Paracoccus haeundaensis* BC74171 у пробірки зі скошеним агаром з PPES-II поживним середовищем та при внесенні вирощеної культури у качалочні колби у боксах встановлюються газові пальники і дотримуються стерильної зони 10 см. У лабораторіях і боксах повітря попередньо знешкоджують від оточуючих мікроорганізмів за допомогою ультрафіолетового опромінення.

Підготовка стисненого стерильного аераційного повітря для культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 та забезпечення асептичних умов в реакторі синтезу наночасток золота проходить наступним чином [29]:

1. Забір атмосферного повітря на висоті 1,5-3 м від найвищої точки біотехнологічного заводу. У даному виробництві на висоті 2 м вище від рівня даху
2. Фільтри попереднього очищення, щоб видалити повітря від грубих механічних частинок
3. Стиснення повітря у компресорі. Тиск повітря досягається до 0,35 МПа, що дає змогу долати місцеві опори в подальшій повітропідготовці та гідравлічний опір у ферментері через барботер. Стиснене повітря має високу температуру і збільшений вологовміст.
4. Охолодження повітря за допомогою водяного теплообмінника охолоджувача повітря.
5. В ресивері волога конденсується і видаляється для запобігання злиплення і виведення з роботи, а також розмноження осілих мікроорганізмів в подальших фільтрах очистки. У цьому апараті відбувається згладження пульсацій повітря від компресора, що вберігає фільтри від руйнування.

6. Повітря підігрівають парою у теплообмінниках нагрівачах. Це дозволяє стабілізувати параметри (вологість і температуру) повітря на подальші стадії.

7. Очищення повітря на головних фільтрах з мікроскловолокна до ступеня очищення від частнок $E = 99\%$.

У якості фільтрувального матеріалу обираємо базальтові волокна, що можна простерилізувати гострою парою.

8. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах з політетрафторетилену, які встановлені на ферментерах. Ступінь очистки повітря дорівнює 99,999%.

Це фільтри патронного типу, в якості фільтрувального матеріалу було обрано політетрафторетилен, який може стерилізуватися гострою парою.

Очищення відпрацьованого повітря. Враховуючи що продуцент не є патогеном, відпрацьоване повітря надходить до системи фільтрів, які конструктивно пов'язані з ферментером і потім утилізуються.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Під час культивування в ферментері *Paracoccus haeundaensis* BC74171 підтримується оптимальний температурний режим 25°C, значення рН 8 та посилена аерація. [27]. Такі умови є сприятливими для розвитку інших груп мікроорганізмів, які можуть контамінувати. Тому необхідно забезпечити асептичні умови культивування. Одним із етапів допоміжних робіт є санітарна підготовка персоналу, приміщень, обладнання та комунікацій, підготовка технологічного одягу. Згідно з GMP для мінімізації випадків контамінації є «планування процесів, конструкцій обладнання, технічних засобів, систем водопостачання, а також умови підготовки та додавання реагентів, відбір проб і навчання персоналу» [30].

Підготовка приміщень.

Культивування має здійснюватися в чистих приміщеннях, захищених повітряними фільтрами високої ефективності частинок повітря (HEPA). Здебільшого 99,97 % усіх частинок у повітрі розміром 0,5 мкм затримується цими фільтрами. Вимоги до таких приміщень дуже суворі і зазвичай пов'язані з надлишковим тиском у цих зонах від захисту зовнішнього повітряного забруднення. Також для зменшення ризику контамінації проводять щозмінне та генеральне прибирання [31].

Підготовка обладнання.

Для підготовки обладнання спочатку очищають та миють поверхні для зниження мікробної чисельності. Ефективне очищення вимагає використання миючих засобів, які включають мийні засоби та розчинник в певних концентраціях, рН, температурі, проміжках часу та інтервалу. Зони необхідно старанно очищати згідно з валідованим протоколом. Перевіряють на герметичність обладнання та комунікації, потім стерилізують гострою парою, витримують на певний проміжок часу (час експозиції) та охолоджують [29].

Підготовка персоналу.

Згідно GMP «персонал є основним джерелом контамінації під час виробництва. Для зменшення ризику контамінації та збереження якості продукту проводяться обов'язкове навчання персоналу при прийомі на роботу, проходження медоглядів. Забезпечення чистим та стерильним технологічним одягом з мінімальним ворсовиділенням, що міняється кожної зміни. Рукавички під час роботи потрібно регулярно дезінфікувати та змінювати, маски змінювати принаймні кожну зміну. Не допускається до виробничого процесу персонал, який має ознаки інфекційні хвороби, некротичні захворювання шкіри» [30].

Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів.

Дана стадія є важливою для підготовки обладнання та приміщень, рук персоналу до роботи з метою унеможливити ризик контамінації продукту та перехресної контамінації. Під час цієї стадії готуються розчини миючих та дезінфікуючих засобів потрібної концентрації та дотримуються умов використання (температура, рН, час експозиції, кількість засобу) для ефективного знешкодження контамінантів.

Миючі та дезінфікуючі засоби вкрай важливо контролювати показники щодо мікробіологічної чистоти (КУО бактерій та грибів). Їх робочі розчини слід зберігати в попередньо очищених та простерелізованих контейнерах й зберігати лише протягом термінів, що є валідовані або зазначені виробником (за винятком тих

розчинів, що стерилізують). Миючі та дезінфікуючі засоби, що використовуються в зонах класів А і В, перед використанням мають бути стерильні, зазвичай пропускають через фільтр з розмірами по 0,22 мкм [30].

Санітарна обробка чистих зон має особливо важливе значення. Поверхні приміщень (підлога, стіни, двері), обладнання, руки персоналу перед запуском виробництва необхідно старанно очищати та дезінфікувати згідно з письмовою методикою на підприємстві. Потрібно завжди пам'ятати, що необхідно підібрати для дезінфекції декілька типів дезінфікуючих засобів для уникнення розвитку резистентних штамів. Також проводять їх контроль ефективності принаймні 1 раз на 2 тижень. Миючі та дезінфікуючі засоби обов'язково контролюють на мікробіологічну чистоту. Їх розчини необхідно зберігати в попередньо очищених та стерильних контейнерах протягом установлених термінів згідно валідованих методик. Миючі та дез.засоби, що використовуються в чистих зонах, перед використанням проходять стерилізуючу фільтрацію з розмірами пор 0,22 мкм. Дезінфекція проводиться строго після миття. [30].

У табл. 5.1 наведено потенційно придатні миючі та дезінфікуючі засоби для фармацевтичної, мікробіологічної, біотехнологічної та харчової галузі. Вони різняться за спектрами антимікробної дії, корозійною активністю, безпекою на організм людини, екологічністю та стабільністю.

Узагальнена характеристика мийних і дезінфікуючих засобів

Таблиця 5.1

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (склад і концентрація ДР)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація розчину для дезінфекції /миття, %	Веб-сайт виробника
1	2	3	4
<p>Засіб мийний з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401» («Clean&Dez 401») (діючі речовини: натрію гіпохлорит-50,0% (вміст активного хлору 5,0%-9,0%), аніоногенні та неіоногенні ПАВ.</p>	<p>Поверхні приміщення та обладнання</p>	<p>0,1 (час експозиції 15 хв)</p>	<p>https://www.mpi-dpr.com.ua/content/24-klindez-401-metodichni-vkazivki</p>
<p>Засіб дезінфекційний "ПРАЙМДЕЗ КОМБІ" (діючі речовини: дидецилдиметиламоній хлорид – 3,15-3,85 %, N-(3-амінопропіл)-Nдодецилпропан-1,3 діамін – 5,23 – 5,77 %)</p>	<p>Поверхні приміщення та обладнання</p>	<p>0,25 (час експозиції 30хв)</p>	<p>https://amoreshop.com.ua/ua/praymdez-kombi-zasib-dlya-dezinfektsiyi-ta-holodnoyi-sterylizatsiyi-1000-ml/</p>
<p>Засіб дезінфікуючий з мийним ефектом «Dezaldum 20» (діючі речовини:мас.,%: 16,5–19,75 алкілдиметилбензиламоній хлорид; 10,5–11,5 глутаровий альдегід)</p>	<p>Поверхні приміщень та обладнання</p>	<p>0,1 - (час експозиції 30 хв) 0,5 - (5 хв)</p>	<p>https://atma.ua/profesijna-himiya/dezynfektsiya/zasib-dezinfikuyuchyjdlya-poverhondezaldum-20-51-da015000/</p>

Засіб дезінфекційний "АНІОСРАБ 85 НПК (ANIOSRUB 85 NPC)" (діюча речовина: етанол - 66,5 - 73,5 %)	Руки персоналу	готовий до застосування (час експозиції 30 сек)	https://eaglepharm.kiev.ua/ua/p219182-360-zhidkoe-spiritovoe-sredstvo.html
Засіб дезінфекційний MDA 72 (діючі речовини: спирт ізопропіловий — 72%, алкілдиметилбензиламоніум хлорид -0,15%)	Руки персоналу	готовий до застосування (час експозиції 15 сек)	https://blondik.com.ua/ua/p115945562-0-antiseptik-dlya-dezinfektsii.html

Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь приміщень та обладнання

Засіб «Кліндез 401» дозволено використовувати підприємствах харчової промисловості, також для миття та дезінфекції промислового обладнання. Він ефективний щодо широкого спектру грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів, такі як збудники туберкульозу, *P.aeruginosa*, *S.aureus* мультирезистентний стафілокок (MRSA), також против аденовірусів, віруси грипу, вірусу гепатиту А, В, С. Має спороцидну і фунгіцидну дію. При контакті зі слизовими оболонками потрібно бути обережним, тому що спричинює місцево-поразною дію. Не має мутагенного, канцерогенного ефекту. Допускається зберігання робочого розчину не більше 3х днів, чутливий до світла. Але гіпохлорити є нестабільними, токсичними, окислювальними, корозійними, відсутні антиадгезивні властивості. [32]

Засіб «Праймдез Комбі» може використовуватися на фармацевтичних, мікробіологічних та біотехнологічних підприємствах. В дезінфіканти не можна додавати мила та аніонні поверхнево-активними речовини. Не викликає корозійних процесів. Засіб має бактерицидні властивості проти ряд мікроорганізмів (*Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella*

pneumonia), проти збудників туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis hominis*, *Mycobacterium terrae*), має фунгіцидні властивості, віруліцидні властивості та спороцидні властивості (спори *Bacillus subtilis*). Засіб не викликає алергії, не має мутагенного й канцерогенного впливу. Робочі розчини можна зберігати протягом 5 днів. Нетоксичний, запобігає повторному росту, антиадгезивні властивості, не подразнює слизові оболонки, не викликає корозії. Але інактивується при кислому середовищі та солями (Ca^{2+} і Mg^{2+}) може розвиватися до нього резистентність, неефективний проти грамнегативних бактерій [32].

Засіб «Dezaldum 20» використовується на фармацевтичних, хімічних, біотехнологічних заводах. Має такий же бактерицидний спектр дії як «Праймdez Комбі». Окрім четвертинних амонієвих сполук, входить глутаровий альдегід, який ефективний у низьких концентраціях, дешевий, не викликає корозії, спороцидний. Але має низьке проникнення в біоплівки, розкладається до мурашиної кислоти, токсичний, сильний подразник слизових оболонок [32].

Дезінфікуючі засоби для обробки рук персоналу

Дезінфікуючі засоби для обробки рук персоналу зазвичай представлені на ринку спиртовмісними. Наприклад, можна використовувати "Аніосарб 85 НПК» і засіб дезінфекційний MDA 72, які є готовими до використання. Ефективність спиртів проти вегетативних бактерій і грибів зростає з їхньою молекулярною масою (тому етанол ефективніший за метанол і, в свою чергу, ізопропілові спирти ефективніші за етанол). Спирти діють на мембрану бактеріальної клітини, роблячи її проникною, і ефективність підвищується за наявності води, що призводить до витоку цитоплазми, денатурації білка та кінцевого лізису клітин. Переваги використання спиртів включають відносно низьку вартість, не токсичність, без специфічного запаху і швидке випаровування, не шкодить навколишньому середовищу [33].

Вибираючи миючі і дезінфікуючі засоби, було врахована їхній вплив на персонал, обладнання, навколишнє середовище при їх утилізації. Так засіб «Клінdez 401» має корозійні властивості, місцево-подразнюючу дію на слизові оболонки і

легко окислюється. Засіб «Dezaldum 20» і «Праймдез Комбі» мають четвертинні амонійні сполуки, які є безпечними для організму людини, легко інактивувати.

Синтез наночастинок золота з використанням *Paracoccus haeundaensis* BC74171 проводиться протягом 30 днів, за яких відбувається 12 циклів, і передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 10 л, реактор-змішувач для солей 10 л, реактор-змішувач для генерування наночастинок золота 10 л, качалки, бокс та лабораторне устаткування. Виробництво вимагає такі приміщення: цех виробничого біосинтезу, лабораторія, де розташовуються автоклави, бокс для пересівів музейних культур і стартової культури в качалочці колби, термостати, апаратура (спектрофотометр, наносайзер) для проведення технологічного контролю. План приміщення згідно будівельних норм біотехнологічного виробництва і GMP враховує діаметри обладнання, устаткувань та відстань між апаратами (не менше 1 м) і від стін (1...1,5 м). На рис. 5.1 вказано приблизний план приміщення та розташування обладнання. Габаритні розміри основного обладнання вказані в таблиці 5.1.

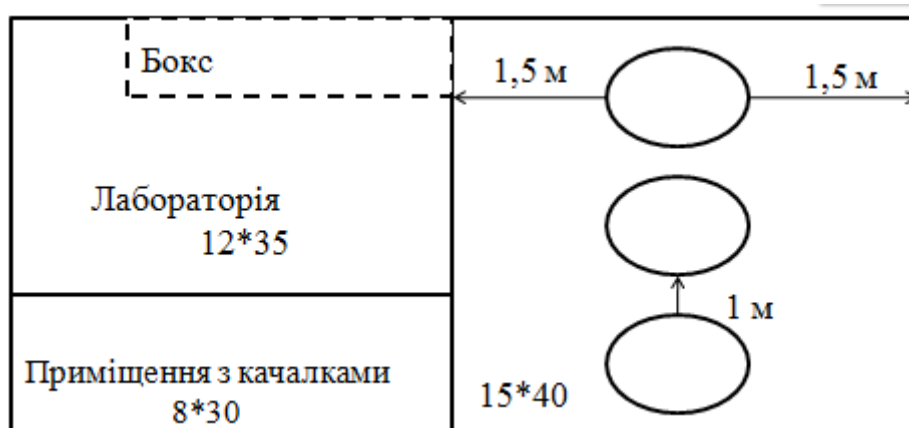


Рис.5.1. Ескіз плану приміщень для виробництва наночастинок золота з використанням *Paracoccus haeundaensis* BC74171

Габаритні розміри основного обладнання для синтезу наночастинок золота з використанням *Paracoccus haeundaensis* BC74171

Таблиця 5.1

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, л	Висота, м
Ферментер	10	0,25	0,8
Реактор-змішувач для приготування солей	10	0,25	0,8
Реактор-змішувач для синтезу AuNPs	10	0,25	0,8
Всього	30		

За отриманими даними табл. 5.1, загальний об'єм реакторів-змішувачів (для солей і синтезу наночастинок золота) та біореактору для культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 становить 30 л. Для того щоб забезпечити чистоту виробничих приміщень, миття підлоги згідно GMP проводиться щодня кожену зміну, в даному випадку це 60 разів. Один раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (миття і обробка стін, підлоги, вікон, всіх можливих поверхностей), тобто 1 раз на 30 днів. Для розрахунку кількості мийних та дезінфікуючих засобів потрібно враховувати приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, приймаючи площу підлоги приміщення та площу стін на висоту 2,5 м. Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 15 м² (3×5 м), площа стін – $[(3 \times 2,5) + (5 \times 2,5)] \times 2 = 40 \text{ м}^2$, загальна площа – $15 + 40 = 55 \text{ м}^2$. Сумарну площу поверхні миття та обробки мийними засобами наведено у табл. 5.2.

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Сумарна площа, м ²
Цех культивування та синтезу наночастинок золота	15	40	55
Лабораторія з боксом	12	35	47
Приміщення з качалками	8	30	38
Сумарна площа	35	105	140

Кількість виробничих циклів для синтезу наночастинок золота встановлено 12. Миття обладнання, обробка комунікацій відбувається перед кожним циклом культивування, тому кількість процесів миття за весь період виробництва наночастинок золота складає 12+1 (миття після останнього циклу). Тоді сумарний об'єм миття становитиме:

$$30 \times 13 = 390 \text{ л}$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та дезінфекції за весь період виробництва наночастинок золота з використанням *Paracoccus haeundaensis* BC74171 наведено в табл. 5.3.

**Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції оброблюваного об'єкту за
весь період синтезу наночастинок золота**

Об'єкт миття та дезінфекції	Площа оброблюваного об'єкту, м² (л)	Число процесів миття та дезінфекції за весь період синтезу наночастинок золота	Загальна площа миття та дезінфекції об'єкту за весь період синтезу, м² (л)
Обладнання	30	13	390
Підлога	35	60	2100
Стіни, двері, вікна	105	4	420

Дані щодо вибору мийних та дезінфікуючих засобів наводиться у вигляді узагальнюючої таблиці (табл.5.4.).

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва наночастинок золота

Назва запропонованого мийного/дезінфікувального засобу (ДР)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація для миття/дезінфекції, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції за весь період синтезу наночастинок золота, м ² (л)	Об'єм робочого розчину за весь період виробництва наночастинок золота, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наночастинок золота, грн
Каустична сода (NaOH)	Обладнання	1	390	195	57	5,7	1112
«Праймдез Комбі» (ЧАС)	Обладнання	0,25	390	195	700	0,2	39
«Dezaldum 20» (ЧАС + глутаровий альдегід)	Обладнання	0,5	390	195	132	0,62	121
«КлінДез 401» (натрій гіпохлорит + ПАР)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	2520	252	180	0,2	50,4
«Вернедор-Преміум» (ЧАС + полігексаметиленгуанідин гідрохлорид)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	2520	252	636	0,64	161,3
«Фагосурф» (ЧАС + неіоногенні ПАР)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,25	2520	252	513	1,28	322,6

Примітка: ціни наведені станом на 09.04.2023

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації живильного середовища для культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171

Для культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 використовується середовище такого складу (комерційне поживне середовище Marine Broth (MB)) (г/л) [27]:

- Пептон – 5
- Дріжджовий екстракт – 1
- $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 0,1
- NaCl – 19,45
- MgCl_2 – 5,9
- MgSO_4 – 3,24
- CaCl_2 – 1,8
- KCl – 0,55
- KBr – 0,08
- NaF – 0,0024
- NH_4NO_3 – 0,0016
- Na_2HPO_4 – 0,008

Для вирощування посівного матеріалу продуценту в колбах використовують таке саме поживне середовище.

Стерилізують усі компоненти поживного середовища, поділивши їх на композиції.

Обґрунтування стадії підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування стартової культури *Paracoccus haeundaensis* BC74171

Поживне середовище для вирощування інокуляту продуцента залишається таке ж саме, яке зазначено вище.

Для отримання необхідної кількості посівного матеріалу потрібно у 6 качалочних колбах об'ємом 750 мл приготувати 0,8 л поживного середовища.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 умовно ділимо його композиції, що відрізняються за режимом стерилізації :

Композиція А: пептон, дріжджовий екстракт (режим стерилізації 112 °С 0,05МПа упродовж 30 хв.)

Композиція Б: $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaCl , MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 , KCl , KBr (режим стерилізації 131 °С 0,15 МПа упродовж 40 хв)

Стерилізацію композицій А і Б здійснюють в автоклаві.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування живильного середовища для вирощування стартової культури продуцента *Paracoccus haeundaensis* BC74171 в колбах на качалках наведений у табл. 2.1

Табл. 5.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,8 л середовища

Компонент живильного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Пептон	5	4	А	100
Дріжджовий екстракт	1	0,8		
Вода питна	100 мл			
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0,1	0,08	Б	700
NaCl	19,45	15,56		
MgCl_2	5,9	4,72		
MgSO_4	3,24	2,59		
CaCl_2	1,8	1,44		
KCl	0,55	0,44		
KBr	0,08	0,064		
Вода питна	675 мл			
Розчин мікроелементів	-	-	-	1
Усього:				0,8 л

У даному випадку при розрахунку питної води для приготування композиції А поживного середовища від об'єму рідини не віднімається. Вода для приготування композиції Б віднімалася приблизно 25 мл, так як маса солей становила більше ніж

10 г. Також не віднімають об'єм посівного матеріалу з пробірок, тому що при внесенні у качалочні колби він складає малу кількість.

Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *Paracoccus haeuundaensis* BC74171 у ферментері 10 л

Для цієї стадії необхідно приготувати 5 л поживного середовища. Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: пептон, дріжджовий екстракт (режим стерилізації 112 °С 0,05МПа упродовж 30 хв.)

Композиція Б: $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaCl , MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 , KCl , KBr (режим стерилізації 131 °С 0,15 МПа упродовж 40 хв)

Композицію Б розчиняють в окремому реакторі-змішувачі для солей з термостатуванням, з якого потім вони будуть подані у ферментер, де проводиться стерилізація. Композиція А стерилізується в автоклаві.

Заливають питною водою об'ємом 1700 мл (з урахуванням утвореного конденсату 10% під час стерилізації гострою парою) та посівного матеріалу 0,8 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для культивування продуцента у ферментері об'ємом 10 л наведений у табл. 2.2.

Табл. 5.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5 л середовища

Компоненти поживного середовища	Кількість для приготування 5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Пептон	25	А	500
Дріжджовий екстракт	5		
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0,5	Б	2500
NaCl	97,25		
MgCl_2	29,5		
MgSO_4	16,2		
CaCl_2	9		

Продовження таблиці 5.6.

KCl	2,75	Б	
KBr	0,4		
Вода питна			1700
Розчин мікроелементів	-	-	6

Обґрунтування способу підготовки та стерилізації розчину солі тетрахлораурату для виробничого біосинтезу наночастинок золота

Для проходження реакції відновлення солі тетрахлораурату водню до наночастинок золота потрібно підготувати стерильний 1 М розчин. Готується і стерилізується розчин в колбі в автоклаві. Для приготування 1М розчину потрібно 22,43 г солі та долити в колбу дистильованою водою до 66 мл.

Стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв. Готовий розчин вноситься в реактор в об'ємі 5,5 мл. Можна використовувати залишок для подальших циклів виробничого біосинтезу наночастинок.

Обґрунтування вибору розчинів для регулювання рН та запасних розчинів мікроелементів

Для регулювання рН обирають 15% розчини хлоридної кислоти та лугу. Запасні розчини мікроелементів, зважаючи на їх кількість в поживному середовищі менше 10 мг, готують і стерилізують окремо.

Особливості підготовки та стерилізації розчинів хлоридної кислоти та лугу

Соляна кислоти концентрацією з початковою концентрацією 37% розводять дистильованою водою до 15%-ї концентрації. Не стерилізують, бо кислота буде випаровуватися. Використовують негайно, тільки під час культивування.

Для регулювання рН до лужної реакції під час культивування використовують сіль натрію гідроксиду і розводять дистильованою водою до 15%-ї концентрації. Розчин стерилізують в автоклаві при 0,15 МПа 131°С впродовж 40 хв.

Особливості підготовки та стерилізації запасних розчинів мікроелементів

Необхідно визначити вміст мікроелементів NaF, NH₄NO₃ та Na₂HPO₄, необхідні для вирощування інокуляту в колбах та для культивування в ферментері (табл. 5.7). Дані, наведені у табл. 5.7 свідчать про те, що для вирощування стартової культури продуцента *Paracoccus haeundaensis* BC74171 в колбах на качалках необхідно готувати у вигляді запасних розчинів даних солей (враховуючи 1 г солей на 100 мл води), тому що їх кількість в середовищі для культивування становить менше 10 мг. Потім можна вносити в розрахунку 0,1 мл (містить 1 мг).

Табл.5.7

Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу *Paracoccus haeundaensis* BC74171

Стадія процесу	Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів, мг		
		NaF	NH ₄ NO ₃	Na ₂ HPO ₄
Вирощування в колбах	0,8	1,92	1,28	6,4
Культивування в ферментері	5	12	8	40

5.2. Основні етапи виділення та сушіння наночастинок золота

Ультрацентрифугування

В наукових статтях для виділення та очистки наночастинок золота використовують метод ультрацентрифугування. Потрібно враховувати, що однією важливою ознакою наноматеріалів є те, що їх осідання неможливе в гравітаційному полі, тому що в дисперсійному середовищі вони рухаються за рахунок дифузії, спричиненої зіткненнями частинок. Таким чином, зовнішнє відцентрове поле є обов'язковим для седиментації наночастинок замість гравітаційної седиментації. Для порівняння, мікрочастинки із типовим діаметром 1 мкм, сила тяжіння більша

порівняно з їх тепловим рухом, тому осадження проводиться у відносно розумному часовому масштабі [34].

Після закінчення генерування наночастинок золота з супернатанту, відбувається їх відділення та очищення від секретованих мікробами біомолекул, надлишку солі HAuCl_4 та інших домішок, які можуть впливати на біологічну активність та ефективність. Тому проводиться ультрацентрифугування (частота обертів коливається від 15000 до 20000 об/хв) протягом 15-30 хв, паралельно тричі промивається стерильною подвійною дистильованою водою. Після цього суспендовані наночастинок розливають у флакони і піддають ліофілізації [35].

Сублімаційне сушіння наночастинок золота

Ліофільна сушка є процесом для підвищення стабільності лабільних сполук за рахунок видалення вологи. Цей м'який процес видалення води полягає в сублімації льоду із замороженого стану з наступною десорбцією під вакуумом [36].

Під час процесу ліофілізації зразок спочатку заморожують в сушильній камері при -28°C протягом 6 год. Потім тиск у ліофілізаторі знижується, що призводить до сублімації льоду води безпосередньо з твердої фази в газову фазу. За рахунок різниці температур в сушильній камері і в конденсаторі, волога видалається із продукту. Потім температуру зразка поступово підвищують, щоб полегшити видалення залишків води. Цей процес зазвичай відбувається в діапазоні температур $20-30^\circ\text{C}$, але може варіюватися залежно від конкретного зразка та налаштувань ліофілізатора. Тиск, який використовується при ліофілізації, як правило, становить від 50 до 100 мбар [36,37].

Оптимальні умови ліофілізації можуть змінюватися залежно від таких факторів, як розмір, концентрація та хімічний склад поверхні наночастинок (для кон'югованих з лікарськими сполуками обирають вид кріопротектора та ліпопротектора для запобігання агрегації). Тобто, тиск і температура, які встановлюються під час сублімаційного сушіння, повинні бути підібрані експериментально. В наукових статтях ці параметри не було виявлено.

Під час ліофілізації наночасток золота, важливо враховувати такі критичні чинники:

- Вибір розчинника. Це впливає на стабільність і морфологію наночасток золота під час ліофілізації. Важливо вибрати розчинник, який може суспендувати наночастинки та підтримувати їх стабільність під час стадій заморожування та сушіння ліофілізації. Зазвичай використовується деіонізована або стерильна дистильована вода.

- Концентрація наночастинок. Вищі концентрації можуть призвести до агрегації або нестабільності наночасток під час процесу, тоді як нижчі концентрації можуть призвести до нижчого виходу.

- Швидкість заморожування. Повільна швидкість заморожування може призвести до утворення великих кристалів льоду, які можуть пошкодити наночастинки. Рекомендується використовувати високу швидкість заморожування, щоб мінімізувати утворення кристалів льоду.

- Температура заморожування. Температура, яка використовується для ліофілізації, повинна бути оптимізована на основі специфічних властивостей наночасток золота та використовуваного розчинника. Може становити від -40°C до -80°C .

- Умови зберігання. Після ліофілізації наночастинки золота слід зберігати у відповідних умовах, щоб зберегти їх стабільність і запобігти деградації. Рекомендується зберігати ліофілізований продукт у сухій, темній та прохолодній середовищі, щоб запобігти впливу світла, вологи та тепла [38].

5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів для отримання субстанції наночастинок золота

Препаративна ультрацентрифуга

Ультрацентрифуги — це тип центрифуг, призначених для обертання зразків на «надвисоких» швидкостях, зі швидкістю обертання до 150 000 об/хв, створюючи

відцентрову силу до понад $1 \text{ мільйон} \times g$. Усі центрифуги можуть розділяти види всередині рідини за щільністю, але високе відцентрове прискорення ультрацентрифуг дозволяє зосередитися на тих крихітних відмінностях розмірів між молекулами, як-от білки чи нуклеїнові кислоти, наночастинки [39].

Існує два основних типи ультрацентрифуг, які використовуються для розділення наночастинок: аналітичні та препаративні.

Аналітичні ультрацентрифуги використовуються для характеристики розміру та визначення концентрації молекул. Вони можуть надати детальну інформацію про седиментаційну поведінку частинок в режимі реального часу, включаючи їх розподіл за розміром і форму. Вони більш дорогі за рахунок додаткової оптичної системи для моніторингу та їх використання здебільшого обмежується науковими дослідженнями вивчення макромолекул і білкових комплексів [40].

Препаративні ультрацентрифуги використовуються для великомасштабного розділення наночастинок за їх розміром і щільністю. Їх можна використовувати для очищення та виділення конкретних типів наночастинок для подальшого аналізу чи використання. Більш підхожа для виділення та очищення наночастинок золота є препаративна ультрацентрифуга XPN-80 (Optima, США). Максимальна швидкість : 80 000 об./хв , максимальний об'єм 1,5 л, прискорення вільного падіння $548300g$ [41].

Ліофілізатор

Для ліофільного висушування можемо використати сублимаційну сушарку EYELA FDU- 2110 продуктивністю 3л/цикл висушування. Температура конденсатора може досягати до -80°C . Вакуумний насос з частотою 60 Гц. В автоматичному режимі вимірюється температура охолодження та сушіння, частота обертання насосу. Габаритні розміри Ш700*В935*Д550 мм [42].

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДО ФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ, КУЛЬТИВУВАННЯ ТА СИНТЕЗУ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та синтезу наночастинок золота

Позначки на апарат.схеми	Назва	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Встановлюється від попадання сторонніх предметів в систему підготовки повітря [43]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтрувальний матеріал – поліестер, площа фільтрації – 0,19 м ² , Е = 90% («VOLZ Filters», Німеччина) [44]
К-3	Компресор	1	Потужність 0,3 кВт, безмасляний, продуктивність 45 л/хв., робочий тиск – 2/3,2 атм («Intertool», Китай) [45]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Водяний трубчатий охолоджувач, пропускна здатність – 30-80 л/хв., пов.теплообміну – 0,26 м ² («ОМТ», Італія) [46]
РС-4	Ресивер	1	3 л, йде в комплекті з компресором [45]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплоносій-водяний, продуктивність – 2000 м ³ /год, площа поверхні – 6,7 м ² , робочий тиск – 1,2 МПа («ВНВ», Україна) [47]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтрувальний матеріал – волокнистий, витрата повітря – 1000 л/хв. («Омі», Італія) [48]
Р-8	Реактор	1	Реактор-змішувач з сорочкою для розчинення солей об'ємом 5 л, матеріал - боросилікатне скло, шв.мішалки – 50-500 об/хв., габарити – 591×520×1594 («MRS lab») [49]

НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Дзюба М.В.			
Консульт.					
Керівник		Скороцька О.І.			
Н. Контр.					
Зав.каф.		Стабніков			
			Літ.	Арк.	Акрушіє
				58	2 58
Кафедра БТМ					

Продовження таблиці 6.1

Н-9 Н-12 Н-14 Н-16	Насос	4	Перистальтичний насос МР-3, продуктивність – 31 л/год, напір – до 1,4 бар («Debem», Італія) [50]
Ф-10 Ф-17	Фільтр індивідуальної очистки	2	Фільтруючий матеріал – політетрафторетилен, Е = 99,999%, поверхня – 1,5 м ² , 0,22 мкм («Sartofluor», Германія) [51]
ФР-11	Ферментер	1	Пілотний ферментер BR500-М1 з нержавіючої сталі SS304, роб. об'єм – 9,8 л, шв. перемішування – 5-1000 об/хв., тиск 0,3 МПа («Lab1ST», США) [28]
Ц-13	Центрифуга	1	Проточна центрифуга Centritech VS Pilot, шв.подачі – 1 л/хв., сила – до 20000g («CARR», США) [52]
Ф-15	Фільтр	1	Патронний фільтр, діаметр пор - 0,22 мкм, фільтраційна площа – 0,18 м ² («Optiseal») [53]
Р-18	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач для біосинтезу наночасток з рубашкою, об'єм – 10 л (під замовлення), роб.тиск - 0,3МПа, матеріал – нержавіюча сталь, шв. мішалки- 125-860 об/хв., розмір посудини - 250×402 («Pharmatec GmbH», Німеччина) [54]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ,КУЛЬТИВУВАННЯ ТА СИНТЕЗУ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

Технологічна схема отримання наночастинок золота за допомогою супернатанту *Paracoccus haeundaensis* BC74171 включає допоміжні роботи (підготовка повітря для аерації, підготовка і стерилізація живильних середовищ для вирощування стартової культури і культивування, розчину 15% її хлористоводневої кислоти та їдкою натру та 1 М розчину тетрахлораурата), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування *Paracoccus haeundaensis*, центрифугування для отримання супернатанту, синтез наночастинок золота).

Технологічну схему отримання наночастинок золота наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка стерильного аераційного повітря [10].

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря.

Забір атмосферного повітря відбувається за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1), який знаходиться на 2 м вище від рівня даху біотехнологічного виробництва (3 м), яке буде переміщене до обладнання для стиснення та очищення від грубих часточок;

ДР 1.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток.

Очищення повітря від пилу з розміром часток $\delta > 50 \mu\text{м}$ на тканинних фільтрах грубого очищення (Ф-2) . Ступінь очищення від механічних частинок становить 90%.

ДР 1.3. Стиснення повітря.

Стиснення повітря задля подолання опорів комунікацій і гідростатичного опору в культуральній рідині відбувається в компресорі (К-3) до тиску $P=0,35 \text{ МПа}$. Повітря нагрівається до 120-250°C.

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дзюба М.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						60	7
Керівник		Скроцька О.І.			66		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков					

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи

Охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» (25-30 С), при якій наявна волога конденсується у водяному теплообміннику (Т-4). Зайва волога виводиться через краплевловлювач ресивера (РС-5), де також зменшується інтенсивність пульсацій руху повітря для попередження негативної дії на роботу подальших фільтрувальних матеріалів.

Вологість повітря повинне становити 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря.

У теплообмінниках (Т-6) відбувається стабілізація показників температури та тиску повітря, яка досягається нагріванням до температури близько 45-50 С парою. Вологість повітря повинне становити 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі.

Як матеріал для очищення повітря використовують грубе базальтове волокно, яке міститься в головних набивних фільтрах (Ф-7). Ступінь очищення повинне становити 90%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі.

Як матеріал для отримання аеруючого повітря можна використовувати політетрафторетилен, який витримує стерилізацію гострою парою. Так як ферментер невеликого розміру, виробники можуть комплектувати його вже з додатковими індивідуальними фільтрами (Ф-10). Повітря очищається до 99,9999%.

ДР 2. Приготування розчину соляної кислоти та натрію гідроксиду.

ДР 2.1. Приготування 15% розчину хлористоводневої кислоти для виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 л.

У колбу об'ємом 25 мл за допомогою мірного циліндру вносять 0,5 мл соляної кислоти концентрацією 37% та доводять об'єм піпеткою до 6,3 мл питною водою. Приготований розчин надходить до стадії ТП 7.1.

ДР 2.2. Приготування 15% розчину натрію гідроксиду для виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 л.

За допомогою технічних терезів відважують 3 г натрію гідроксиду і пересипають у колбу об'ємом 100 мл, потім дистильованою водою доводять об'єм до 50 мл. Розчин стерилізують в автоклаві при 131 МПа . Приготований розчин надходить до стадії ТП 7.1.

ДР 3. Приготування запасного розчину мікроелементів для культивування на качалочних колбах і в ферментері.

Під час культивування посівного матеріалу на качалках та в ферментері, продуцент потребує певний вміст мікроелементів, які містяться в солях натрію фторид, нітрат амонію та натрій гідрофосфат як складові поживного середовища – морський бульйон.

Для приготування запасного розчину мікроелементів, зважують на технічних терезах по 1 г натрію фториду та нітрат амонію і розчиняють в 100 мл дистильованої води. Окремо зважують 1 г гідрофосфат натрію і розчиняють в окремій колбі в 100 мл дистильованій воді. Стерилізують в автоклаві при 131°C 0,15 МПа. Потім можна вносити в розрахунку 0,1 мл (містить 1 мг). На наступних стадіях мікроелементи можна вносити в композицію з іншими солями.

ДР 4 . Приготування та стерилізація розчину тетрахлораурата водню для синтезу наночасток золота.

На технічних терезах зважують 22,43 г тетрахлораурату гідрогену, поміщають у колбу об'ємом 150 мл, доводять об'єм до 66 мл дистильованою водою, ретельно перемішують струшуючими рухами. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв. Приготований розчин надходить і використовується об'ємом 5,5 мл в стадії ТП 7.4.

ДР 5. Приготування та стерилізація живильних середовищ.

*ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування стартової культури *Paracoccus haeundaensis* BC74171 в колбах на качалках.*

Для вирощування інокуляту в колбах на качалках необхідно приготувати 800 мл поживного середовища. Джерелом вуглецю та азоту ймовірно можуть бути амінокислоти, які містяться в пептоні та дріжджовому екстракті. Морські бактерії виду *Paracoccus haeundaensis* не ферментують ряд вуглеводів. Вміст компонентів для приготування 800 мл середовища :

- Пептон – 5
- Дріжджовий екстракт – 1
- $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 0,1
- NaCl – 19,45
- MgCl_2 – 5,9
- MgSO_4 – 3,24
- CaCl_2 – 1,8
- KCl – 0,55
- KBr – 0,08
- NaF – 0,0024
- NH_4NO_3 – 0,0016
- Na_2HPO_4 – 0,008

Так як пептон та дріжджовий екстракт містять термолабільні речовини, як амінокислоти, вітаміни та т.д., ми можемо стерилізувати їх разом в м'яких температурних режимах. На технічних терезах зважують 4 г пептону, 1 г дріжджового екстракту, поміщають у колбу об'ємом 200 мл, доводять об'єм до 100 мл питною водою, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві при 112 °С 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Інша композиція Б, яка містить солі, потребує жорсткіших умов стерилізації в автоклаві при 131 °С 0,15 МПа упродовж 40 хв. На технічних терезах зважують 0,08 г цитрату заліза, 15,56 г натрію хлориду, 4,72 г магнію хлориду, 2,59 г магнію сульфату, 1,44 г кальцію хлорид, калій хлориду 0,44 г та 0,064 г калію броміду. Суміш солей поміщають у колбу 2 л, і заливають 675 мл питною водою, ретельно перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві.

ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування культури у ферментері об'ємом 10 л.

Для вирощування культури *Paracoccus haeundaensis* BC74171 у біореакторі з геометричним об'ємом 10 л необхідно приготувати 5 л живильного середовища. Потрібно врахувати, що для засіву ферментера використовують рідку стартову культуру *Paracoccus haeundaensis* BC74171, об'єм якої є 0,8 л. Вміст компонентів для приготування 5 л живильного середовища для культивування наведено вище.

За допомогою технічних терезів зважують 25 пептону, 5 г дріжджового екстракту вносять в колбу 1 л і доливають питною водою до 500 мл, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112 °С 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі готують в окремому реакторі-змішувачі (Р-8) з сорочкою і постійним перемішуванням. Зважують на технічних терезах 0,5 г цитрату заліза, 97,25 г натрію хлориду, 29,5 г магнію хлориду, 16,2 г магнію сульфат, 9 г кальцію хлориду, 2,75 г і 0,4 г калію хлориду та броміду відповідно. Заливають до 2,5 л питною водою, включають мішалку і підігрів сорочки для кращого розчинення. Після реактору розчин солей подається перистальтичним насосом (Н-9) у ферментер для стерилізації гострою парою при 131 °С, 0,15 МПа 40 хв. Заливають питною водою об'ємом 1700 мл (з урахуванням утвореного конденсату 10% під час стерилізації гострою парою).

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу *Paracoccus haeundaensis* BC74171.

*ТП 6.1. Підтримання колекційної культури *Paracoccus haeundaensis* BC74171*

Музейну культуру *Paracoccus haeundaensis* зберігають у пробірках з агаризованим середовищем РРЕS-II (зі складом 2; 1; 1; 1; та 0,1 г/л поліпептона, дріжджовий екстракт, ферментативний гідролізат соєвого шроту та заліза цитрат відповідно, та 19 г/л NaCl) в холодильнику при 4±1 °С. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяців задля відбору стабільних штамів. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру *Paracoccus haeundaensis* BC74171, що зберігається в середовищі PPEs-II, розсівають петлею методом ізолюваних колоній на чашки Петрі із PPEs-II агаром та інкубують 48 год при 30 °С.

ТП 6.3. Вирощування культури у пробірках на агаризованих середовищах.

Отримані ізолювані колонії *Paracoccus haeundaensis* BC74171 (від ТП 6.2) пересівають за допомогою петлі в пробірки зі скошеним агаром (косяки) PPEs-II (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають тільки ізолювані колонії, що розташовуються на відстані не менше одного сантиметру. Тривалість вирощування на скошеному агарі *Paracoccus haeundaensis* 48 год.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках.

Для отримання стартової культури *Paracoccus haeundaensis* BC74171 з колби об'ємом 200 мл, 800 мл стерильного поживного середовища (від ДР 5.1) переливають в асептичних умовах у стерильні 6 качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Paracoccus haeundaensis*, вирощену на агарі PPEs-II (від ТП 5.3), вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають суспензію клітин і вносять у колбу з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовується суспензію, одержану з однієї пробірки, тобто 6 пробірок і 6 колб.

Після вирощування бактерій у колбі на качалці з морським бульйоном 18 год при рН 8, 100 об/хв і 25°С культуральну рідину з колби переливають у засівний пристрій, який міститься безпосередньо над біореактором, переносять за допомогою факелу.

ТП 7. Культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171

*ТП 7.1. Культивування *Paracoccus haeundaensis**

Для культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 у ферментатор з робочим об'ємом 10 л (Фр-11) із 5 л поживного середовища (від ДР 5.2) в асептичних умовах через засівний пристрій при горінні факелу вносять посівний матеріал (від ТП 5.4) та розчин натрію гідроксиду (від ДР 2.1) до встановлення рН 8.

Вирощування бактерій у ферментері триває 48 год при рН 8 і 25 °С при оберті мішалки 100 об/хв. За допомогою перистальтичного насосу (Н-12) після ферментації культуральна рідина перекачується до проточної центрифуги (Ц-13) для відділення біомаси *Paracoccus haeuendaensis* BC74171.

Через кожні 3-4 год проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини на наявність контамінації, визначають концентрацію біомаси *Paracoccus haeuendaensis* BC74171, спожитого джерела вуглецю та азоту.

Процес культивування зупиняють приблизно на 48-му годину культивування.

ТП 6.2. Центрифугування культуральної рідини.

Час центрифугування в проточній центрифугі складає 30 хв при 3500 об/хв. при температурі 4°С. Супернатант культуральної рідини надходить на стадію додаткової очистки від баластних компонентів і залишкової біомаси (до ТП 7.2) до фільтра з порами 0,22 мкм (Ф-15).

ТП 6.3. Фільтрування супернатанту.

Отриманий супернатант в об'ємом 5,5 л за допомогою перистальтичного насоса (Н-14) надходить до магістрального фільтра (Ф-15) для очищення від залишкових клітин продуцента. Діаметр пор фільтру 0,22 мкм. Відфільтрований супернатант надходить на стадію синтезу наночасток золота (до ТП 7.4) до реактора-змішувача з сорочкою (Р-18).

ТП 7.4. Супернатант-опосередкований синтез наночастинок золота.

Відфільтрований супернатант 5,5 л з фільтра (Ф-15) за допомогою перистальтичного насоса (Н-16) доправляється до реактору-змішувача з нагрітою рубашкою (Р-18). Також в асептичних умовах вносять 5,5 мл розчину тетрахлораурат водню до концентрації 1 мМ реакційної суміші (від ДР 3.1). Біологічне відновлення наночастинок золота проходить 15 хвилин при 70 °С при постійному перемішуванні під надлишковим тиском, яке нагнітається через фільтр Ф-17. Ознака утворення наночастинок золота – реакційна суміш набуває червоно-винного забарвлення.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж культивування *Paracoccus haeundaensis* BC74171 кожні 4-5 год відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, спожитого джерела азоту (пептон та дріжджовий екстракт). Також після отримання наночастинок золота за допомогою супернатанту відбирають проби реакційної суміші для контролю біоредукції золота та їх формування.

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням.

Культуральну рідину *Paracoccus haeundaensis* BC74171 контролюють на контамінуючі мікроорганізми, розсіваючи методом виснаженого штриха на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для виявлення бактерій та з сусло-агаром дріжджів і грибів, які інкубують 5 діб при 34-36 °С для бактерій і 25-30 °С для грибів і дріжджів. Не повинен бути ріст інших мікроорганізмів на агаризованих живильних середовищах.

Для мікроскопіювання використовують препарати "роздавлена крапля". Препарат "роздавлена крапля" готують на предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини після ретельного струшування, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом з імерсією. У полі зору мікроскопа повинні спостерігатись клітини *Paracoccus haeundaensis* паличкоподібної форми, грамнегативні, неспороутворюючі та не рухливі, діаметром від 0,3 до 0,7 мкм і довжиною від 0,8 до 2,5 мкм [10].

Вигляд колонії на PPES-II агарі гладкі, плоскі, жовтого або помаранчевого кольору через наявність утвореного пігменту астаксантину.

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Дзюба М.В.				Лім.	Арк.	Акрушіє		
Консульт.							67	6	67	
Керівник		Скроцька О.І.			Кафедра БТМ					
Н. Контр.										
Зав.каф.		Стабніков								

Тест на гемоліз негативний, каталазопозитивні [27].

8.2. Показники росту

Для визначення концентрації біомаси, джерел вуглецю і азоту необхідно відібрати 50 мл культуральної рідини та відділити біомасу шляхом центрифугування при 3500 об/хв впродовж 30 хв при 4°C.

8.2.1. Концентрація біомаси.

Ріст біомаси *Paracoccus haeundaensis* BC74171 визначають за оптичною густиною спектрофотометрично при довжині світла близько 600 нм. Для встановлення базової лінії використовують поживне середовища для усунення фонового забруднення піків і вносять у кювету. Вже 3-4 мл культуральної рідини, яка напередодні добре перемішана, вносять в іншу кювету і вимірюють оптичну гуστину. За калібрувальним графіком облять перерахунок на суху біомасу.

8.2.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту.

Враховуючи нездатність ферментувати ряд вуглеводів *Paracoccus haeundaensis* BC74171, можемо припустити, що джерело вуглецю можуть бути амінокислоти та полі- та олігопептиди, які містяться в великій кількості в пептоні. Тому доцільно проводити визначення тільки джерела азоту [20] .

Джерело нітрогену є наявним в поживному середовищі продуцента як пептон та дріжджовий екстракт у формі амінокислот та поліпептидів. Тому слід проводити визначення амінного азоту мідним способом, що базується на властивостях амінокислот та інших пептидів утворювати розчинні комплекси з солями купруму, які в подальшому кількісно визначають йодометрично.

10 мл супернатанту, який був отриманий попередньо, доводять до рН 7, заливають у мірну колбу об'ємом 25 мл і додають 1-2 краплі тимолфталейну і титрують 1 н. натрієм гідроксидом до блідо-синього забарвлення. Потім у колбу додають 10-15 мл суспензію ортофосфату міді у боратному буфері, доводять вміст до мітки дистильованою водою. Збовтують і фільтрують через фільтрувальний

папір. Фільтрат повинен бути повністю прозорим, без осаду, щоб не було спотворення результатів.

Отриманий фільтрат відбирають у конічну колбу і додають 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 0,2-0,4 г калію йодиду. Йод, що виділився, титрують 0,01 н. розчином натрію тіосульфата, додаючи в кінці 1-3 краплі розчину крохмалю до зникнення синього кольору.

Також проводять контрольний дослід, де замість супернатанту використовується такий же об'єм дистильованої води.

Результат обчислюється за формулою:

$$X = \frac{(a - b) * 0.28}{n}$$

де X – вміст амонійного азоту, мг/л;

a – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування дослідного зразка, мл

b – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування контролю, мл

0,28 – мг амонійного азоту на кожен мл 0,01 н. розчину тіосульфату

n – об'єм досліджуваного розчину (супернатант), 10 мл [57].

8.3. Характеристика наночастинок золота

Для характеристики наночастинок необхідно відібрати 10 мл реакційної суміші. Характеристика отриманих наночастинок проводиться шляхом вимірювання спектрів за допомогою спектрофотометра, а також визначення розмірів і форми за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії, визначення середнього гідродинамічного діаметру та стабільність за дзета-потенціалом.

8.3.1. Спектрофотометричний аналіз.

Вимірювання на спектрофотометрі ((UV-670 Jasco, Японія) проводилося при довжині хвилі 350-800 нм, контролем виступає супернатант без тетрахлораурату

водню. 4 мл супернатанту вносять у кювету та встановлюють базову лінію - спектр контролю. Далі 4 мл реакційної суміші з тетрахлорауратом вносять у другу кювету та вимірюють спектр зразку. На спектрі має бути зареєстрований характерний пік при 520-580 нм (в статті 534 нм), що вказує на присутність наночастинок [11].

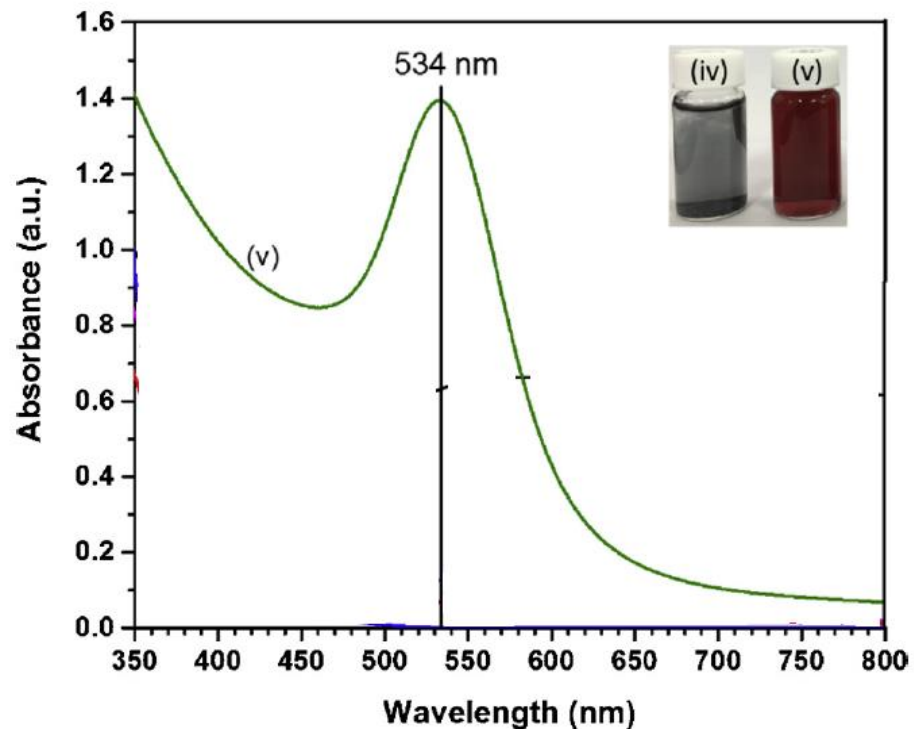


Рис.8.2. Спектр поглинання утворених наночастинок золота (колір реакційної суміші набуває червоного забарвлення)[27]

8.3.2. Трансмійна електронна мікроскопія

Наночастинки виділяють з супернатанту шляхом ультрацентрифугуванням (25 хв, 13000 об/хв) та тричі відмивання дистильованою водою від залишків солі та поживного середовища, та інших домішок. Суспендують в стерильній дистильованій воді та використовують для подальших вимірювань [27].

Крапля приготовленого колоїдного розчину з наночастками золота поміщають на мідний диск з вуглецевим покриттям і сушать при кімнатній температурі перед передачею на ТЕМ (Н7500, Hitachi Ltd., Японія) при напрузі 80 кВ, з роздільною здатністю 0,5 нм. На мікрофотографіях досліджують морфологію, дисперсність та обраховують розміри і середній розмір наночастинок. Середній розмір наночастинок

золота синтезованих *Paracoccus haeundaensis* BC74171 становить $20,93 \pm 3,5$ нм, є сферичними та полідисперсними [27].

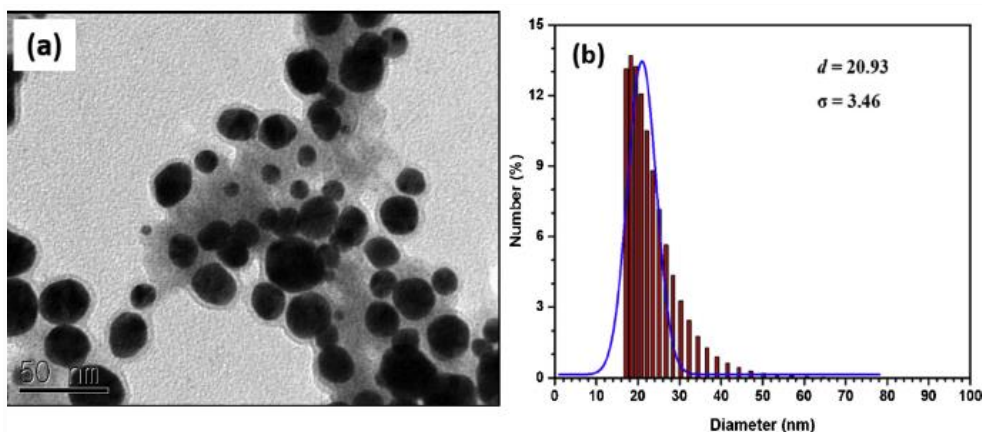


Рис. 8.3 Електронні мікрофотографії та гістограма розмірів всіх наявних наночастинок золота [27]

8.3.3. Вимірювання середнього діаметру та дзета-потенціалу.

Діапазон розмірів AuNP змінюється залежно від TEM та результатів спектроскопії ELS (гідродинамічний середній діаметр) через те, що ELS вимірює гідродинамічний діаметр, а TEM візуалізує металеве ядро наночастинок. Визначення середнього діаметру і дзета-потенціалу проводиться на спектрофотометрі динамічного світлорозсіювання (DLS-8000, Японія) з гелієво-неонним лазером довжиною хвилі 632,8 нм при 25°C, pH 7. Перед вимірюваннями зразки розбавляли деіонізованою водою в 10 разів для усунення багаторазового розсіювання монохромного променя лазером і подальшого спотворення результату. Заливають в кювету розчин і виконують декілька вимірювань. Поверхневі заряди наночастинок (дзета-потенціал) становлять -4,26 мВ, це свідчить про те, що AuNPs несуть молекули негативного заряду на своїх поверхнях, що запобігає агрегації AuNP шляхом електростатичного відштовхування, тобто забезпечують стабільність [27, 58].

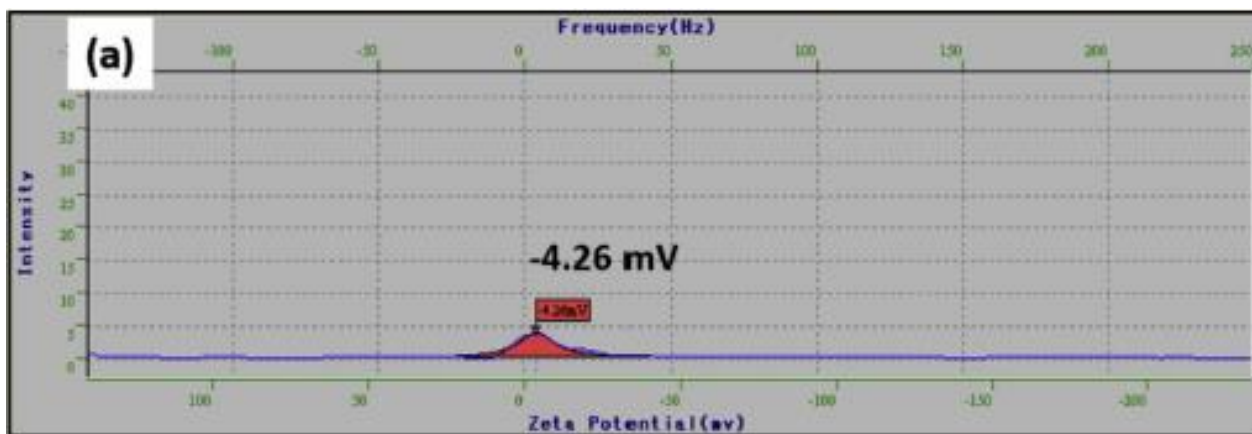


Рис.8.4. Зета-потенціал наночасток золота [27]

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Під час біотехнологічного синтезу виділяються специфічні відходи, які можуть бути у вигляді рідких (супернатант), газоповітряних викидів (аерозоль мікроорганізму), твердих (біомаса біологічного агента, пакувальні матеріали мийних та дезінфікуючих засобів, від компонентів поживних середовищ). Ці відходи можуть чинити негативну дію на стан довкілля та епідемічний стан. Тому потрібно висвітлити наявність всіх можливих відходів виробництва та викласти технологічні рішення знешкодження стічних вод, біомаси, газоповітряних викидів.

Згідно технологічної схеми виробничого культивування та синтезу наночастинок золота проводяться допоміжні роботи (санітарна підготовка виробничих приміщень кожної зміни, підготовка обладнання та комунікацій, система підготовки аераційного повітря, приготування та стерилізації поживних середовищ), ферментаційних технологічних процесів (одержання посівного матеріалу, культивування), та синтез наночастинок золота з використанням супернатанту.

Місця емісії твердих, рідких і газоподібних відходів представлені в таблиці 9.1.

					НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дзюба М.В.				Літ.	Арк.
Консульт.							Акрушіє
Керівник						73	8 73
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Зав.каф.							

Таблиця 9.1

Місця емісії твердих, рідких і газоподібних відходів, що потенційно виділяються на проєктованому виробництві наночастинок золота

Тип відходів	Назва відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Стадія виробництва	Приблизна кількість відходів за 1 цикл виробництва
Стічні води	1%-ий розчин каустичної соди	Натрій гідроксид	Миття обладнання та комунікацій	15 л
	«КлінДез 401»	Натрій гіпохлорит і ПАР	Обробка поверхонь (підлога, стіни)	28 л
	«Dezaldum 20» (ЧАС + глутаровий альдегід)	ЧАС і глутаровий альдегід	Миття та дезінфекція обладнання	15 л
	Розчин супернатанту після ультрацентрифугування	Компоненти поживного середовища, клітини продуцента, наявність наночастинок в мінімальній кількості та солі тетрахлораурат водню	Післяфементаційна стадія	5 л
Газоподібні	Відпрацьоване повітря з ферментера	діоксид Карбону, клітини	Культивування	20,2 м ³

		бактерій		
Тверді	Біомаса продуцента після центрифугування	Клітини продуцента	Післяферментаційна стадія	-
	Пластикові тару для мийних засобів, пакувальні матеріали для компонентів поживного середовища	Поліетилен, поліпропілен	Допоміжні роботи, санітарна підготовка	-

*Тривалість процесу культивування складає 48 год. Аеруюче стерильне повітря подають в ферментер зі швидкістю 1,2 л повітря на 1 л культуральної рідини за 1 хв. У виробничому цеху ферментер 10 л з вмістом 5,8 л культуральної рідини. Розрахуємо об'єм повітря для аерації ферментера: $5,8 \cdot 1,2 = 7$ л/хв. $\cdot 1,2$, враховуємо 48 год культивування то: $7 \cdot (48 \cdot 60) = 20160$ л = $20,2$ м³

9.1 Системи знешкодження рідких відходів

Під час синтезу наночастинок золота з використанням *Paracoccus haerens* утворюються стічні води у вигляді супернатанту та мийно-дезинфікуючих розчинів. Потрібно враховувати їх потенційну небезпечність для навколишнього середовища в разі витіку, тому необхідно встановити підходящу систему знешкодження стічних вод на даному виробництві. Потрібно також враховувати об'єми стічних вод, які бувають виробничими, побутовими й атмосферними.

Середні за зміну витрати побутових стічних вод, що надходять від підприємства, м³/зміну, обчислюють за формулою:

$$Q_e = q_e \cdot n = 17400 \cdot 5,8 = 100920 \text{ л/рік} = 276 \text{ л/добу}$$

де q_e – норма водовідведення в літрах на одиницю продукції, яку випускає підприємство (приймається 17400 л/кг як для дрібнотонажних виробництв (менше 5 т/рік));

n – кількість одиниць продукції (культуральна рідина), що виробляється за зміну (5,8 л).

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 2 = 50 \text{ л/зміну}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л за зміну на одного робітника (приймаємо для холодного цеху 25 л за зміну на людину);

N – кількість робітників, що працюють у зміну.

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = Q_n \cdot N_{зм} \cdot 24/t = 50 \cdot 3 \cdot 24/8 = 450 \text{ л/добу}$$

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

t – тривалість однієї зміни (8 год)

Загальна витрата атмосферних стічних вод за рік орієнтовно приймається як в 15 разів менше за побутові стічні води:

$$Q_a = Q_n/5 = 450/5 = 30 \text{ л/добу}$$

Загальні витрати стічних вод за добу, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 276 + 450 + 30 = 756 \text{ л/добу}$$

Пропонується обрати біологічний метод очищення стічних вод, на якому базується механізми роботи біоплівкового реактора з рухомим шаром The Ecologix MBBR (Тайвань) [62].

Він складається з:

Аеротенк: резервуар схожий на резервуар з активним мулом. Аерація використовується для підтримки в русі активного мулу і носіїв. Система MBBR відокремлює надлишкові бактерії та мул, які направляються в кінцевий сепаратор.

Спеціальні пластикові носії: вони забезпечують поверхню для росту біоплівки. Матеріали-носії виготовлені з матеріалів із щільністю, близькою до води (1 г/см^3), наприклад, поліетилен високої щільності з щільністю $0,9 \text{ г/см}^3$. Ці носії переміщуються в резервуарі через систему аерації. Це забезпечує хороший контакт між стічними водами та біомасою на носіях [59].

Отже, система MBBR складається з системи аерації активного мулу, де мул збирається на перероблених пластикових носіях. Ці носії мають внутрішню велику

поверхню для оптимального контакту з водою, повітрям і бактеріями. Вони ростуть на внутрішній поверхні носіїв, які розщеплюють органічні речовини зі стічних вод. [60].

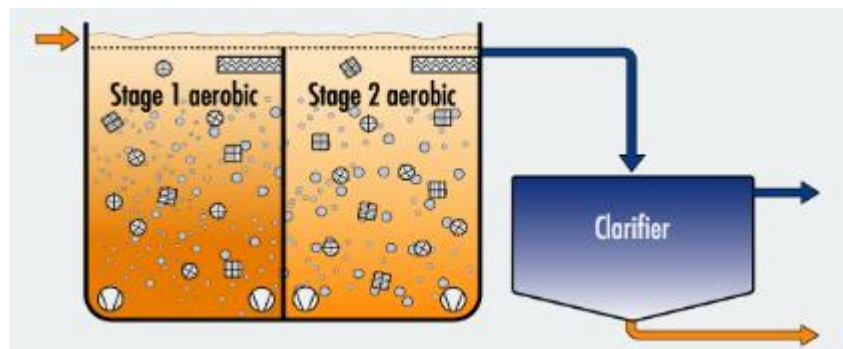


Рис.9.1 Схема біоплівкового реактора з рухомих шаром [61].

Збільшена площа поверхні пластикових носіїв зменшує площу резервуарів, які необхідні для очищення стічних вод, тим самим робить установки компактними. Середовище безперервно перемішується бульбашками з системи аерації, яка додає кисень на дно першого відсіку аеротенка. Насправді середовища MBBR або біочіпи, які використовує виключно Ecologix, мають площу активної поверхні $> 4000 \text{ м}^2/\text{м}^3$, що в шість разів більше, ніж будь-які конкуруючі середовища, доступні сьогодні на ринку [62].



Рис.9.2. Носії для біореактора з рухомих шаром від Ecologix [62]

Вирішальним фактором у процесі біореактора з рухомих шаром є достатній і частий контакт між компонентами стічної води та мікроорганізмами, прикріпленими

до носія. Необхідне змішування елементів-носіїв у реакторі (реакційній ємності) може бути досягнуто за допомогою подачі технологічного повітря, необхідного в процесах аеробної обробки. На характеристики та якість біоплівки, що утворюється на поверхні носія, впливають не лише перемішування та аерація, але й склад і кількість забруднюючих речовин у стічній воді так званий субстрат. Чим більше стічні води забруднені біологічно розкладаними забруднювачами, тим інтенсивніше та швидше зростає біомаса. Проблеми, викликані зниженням ефективності біодеградації, в основному є наслідком інтенсивної товщини біоплівок, що призводить до зменшення площі поверхні активного носія. Але біореактор MBBR BioChip 30 не має цієї проблеми. Його процес дуже відрізняється тим, що біоплівки, які колонізують пори BioChip і намагаються вирости з пор, постійно залишаються тонкими. Таким чином, MBBR BioChip 30 забезпечує постійну високу швидкість видалення біологічних речовин і надійну стабільність процесу. Використовуючи середовище-носій MBBR BioChip 30, планктоміцети можуть назавжди оселитися в захищеній пористій структурі цього носія і, як наслідок, запобігти їх вимиванню з реакційної системи [62].

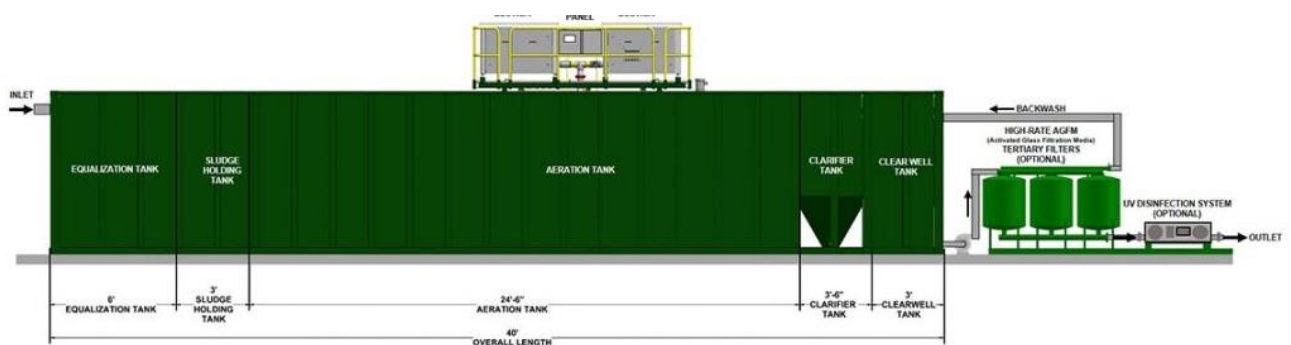


Рис.9.3 Установа біологічного очищення стічних вод від Ecologix [62]

9.2 Системи знешкодження газоподібних відходів

При виробництві наночастинок золота з використанням супернатанту бактерій *Paracoccus haemundensis* виділяється аерозольні частинки з клітинами біологічного агента, їх продукти метаболізму, діоксид вуглецю. Як було розраховано раніше, під час культивування аерують невеликим об'ємом повітря (20,3 м³), тому економічно

вигідно буде встановити підходящий фільтр, який буде затримувати клітини при виході з ферментеру. Пропонується застосувати систему фільтрів відпрацьованого повітря після ферментації (Exhaust Filter Elements). Звичайним матеріалом для фільтруючих елементів асептичної обробки відпрацьованих газів є мембрани товщиною 0,2 мк, що складаються зі гідрофобного політетрафторетилену Sartofluor (Sartorius, Германія). Він повинен проходити тест на цілісність, пов'язаний з випробуванням бактеріального зараження згідно американської методики ASTM F838-83. Це буде гарантувати, що мікроорганізми під час ферментації не будуть проникати в зовнішнє середовище. Але потрібно пам'ятати, що його термін роботи буде обмежуватися вологим потоком газу, що може складатися з рідкої дрібної фази. Тому рекомендується встановити фільтр тонкого очищення зі мікроскловолокна OMI HF0010 (OMI, Італія) [63].

Специфікація фільтрів для знешкодження газоподібних відходів наведена у таблиці 9.2.

Таблиця 9.2.

Технічні характеристики фільтрів для знешкодження газоподібних відходів виробництва

Фірма фільтру, його форма	Фільтрувальний матеріал	Розмір пор, мкм	Можливість стерилізація	Робочий тиск
Sartofluor, катридж	політетрафторетилен	0,2	Автоклавування 134°C, 2 бар, 30 хв.	До 5 бар
OMI	мікроскловолокно	-	Витримує до 100°C	До 16 бар

9.3. Системи знешкодження та утилізації твердих відходів

У процесі синтезу наночастинок золота з використанням *Paracoccus haeundaensis* можуть утворюватися такі тверді відходи, як залишки біомаси після центрифугування і тара мийно-дезінфікуючих засобів, пакувальні матеріали компонентів поживного середовища.

Потрібно зауважити, що під час центрифугування культуральної рідини отримується невелика кількість біомаси. Тому економічно вигідно інактивувати - піддати її спалюванню.

Під час утилізації пластикової тари мийно-дезінфікуючих засобів та упакування компонентів поживного середовища пропонується її помити, просушити та провести сортування, в подальшому передати на підприємство з переробки «Регіон-2001».

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

1. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.9:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика»
2. Настанова МОЗ України 42-01-2003 від 13.03.2003 р. «Лікарські засоби. Технологічний процес. Документація»
3. Міжнародні стандарти ISO серії 9000, 10000, 114000 та SA 8000.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науковоекспертний фармакопейний центр” – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556с.
5. ДСТУ 2636 -94 Загальна мікробіологія. Терміни та визначення.
6. ДСТУ 2881-94 Екологія мікроорганізмів. Терміни та визначення.
7. ДСТУ 2424-94 Промислова мікробіологія. Терміни та визначення.
8. ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни і визначення.
9. ДСТУ ISO 9000 – 2001 Системи управління якістю. Основні положення та словник. Вимоги.
10. ДСТУ EN 12128:2019 Біотехнологія. Лабораторії, що проводять дослідження, розроблення та аналізування. Коефіцієнт заповнення мікробіологічних лабораторій, зони ризику, місце розташування та вимоги фізичної безпеки (EN 12128:1998, IDT)
11. ДСТУ 8115:2015 Біотехнологія. Методи попередження контамінації культур клітин
12. ДБН В.2.5-75:2013 Каналізація. Зовнішні мережі та споруди. Основні положення проектування
13. ДСТУ EN 13053:2013 Системи вентиляції та кондиціювання повітря. Кондиціонери повітря центральні. Номінальні та робочі характеристики складових частин та секцій (EN 13053:2006, IDT)
14. ДСТУ ISO 46001:2021 Системи управління ефективністю використання води. Вимоги та настанови щодо застосування (ISO 46001:2019, IDT)

НУХТ БТЕК 04.01.37КР ПЗ													
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Дзюба М.В.											
Консульт.													
Керівник		Скроцька О.І.											
Н. Контр.													
Зав.каф.		Стабніков											
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Літ.</td> <td style="width: 10%;">Арк.</td> <td style="width: 10%;">Акрушіє</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">81</td> <td style="text-align: center;">2 81</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 5px;">Кафедра БТМ</td> </tr> </table>					Літ.	Арк.	Акрушіє		81	2 81	Кафедра БТМ		
Літ.	Арк.	Акрушіє											
	81	2 81											
Кафедра БТМ													

15. ISO 14644-1:2015. Cleanrooms and associated controlled environments — Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration.
16. Настанова 42-3.3:2004 Лікарські засоби. Випробування стабільності.
17. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-1.0:2005 Фармацевтична продукція. Система стандартизації. Основні положення
18. Настанова «Лікарські засоби. Досьє виробничої дільниці» СТ-Н МОЗУ 42-4.1:2011
19. ДСТУ 2925-94. Якість продукції. Оцінювання якості. Терміни та визначення.
20. ДСТУ 3021-95. Випробування і контроль якості продукції. Терміни та визначення.
21. Закон України «Про відходи» (ЗУ № 187/98) від 05 березня 1998 року № 187/98-ВР
22. Постанова від 2006 року: Про затвердження Порядку державної реєстрації (перереєстрації) дезінфекційних засобів
23. Закон України «Про лікарські засоби» № 123/96-ВР від 04.04.1996.
24. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) , Q1-Q14
25. ISO 22412: 2008 Particle size analysis—Dynamic light scattering (DLS)

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Roya S., Das T.K., Maiti G.P., Basu U. Microbial biosynthesis of nontoxic gold nanoparticles. *Journal Mater. Sci. Eng.* 2016; № 203: 41–51. doi: 10.1016/j.mseb.2015.10.008.
2. Lee K.X., Shameli K., Yew Y.P., Teow S.Y., Jahangirian H., Rafiee-Moghaddam R., Webster T.J. Recent Developments in the Facile Bio-Synthesis of Gold Nanoparticles (AuNPs) and Their Biomedical Applications. *Int Journal Nanomedicine.* 2020; № 15: 275-300. doi: 10.2147/IJN.S233789.
3. Cherian T., Maity, D., Rajendra Kumar R.T., Balasubramani G., Ragavendran C., Yalla S., Mohanraju R., Peijnenburg W. Green Chemistry Based Gold Nanoparticles Synthesis Using the Marine Bacterium *Lysinibacillus odisseyi* PBCW2 and Their Multitudinous Activities. *Journal Nanomaterials;* 2022, №12, 1-26. <https://doi.org/10.3390/nano12172940>
4. Fu, L.-H., Yang, J., Zhu, J.-F., & Ma, M.-G. (2017). *Synthesis of Gold Nanoparticles and Their Applications in Drug Delivery. Metal Nanoparticles in Pharma, 155–191.* doi:10.1007/978-3-319-63790-7_9
5. Conde, J. (2015). *The Golden Age in Cancer Nanobiotechnology: Quo Vadis. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 3.* doi:10.3389/fbioe.2015.00142
6. Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P., & Murray, R. W. (2009). *Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future†. Langmuir, 25(24), 13840–13851.* doi:10.1021/la9019475
7. Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., & El-Sayed, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews, 41(7), 2740-2779.* <https://doi.org/10.3390/nano11020312>
8. Kumar, D., Saini, N., Jain, N., Sareen, R., & Pandit, V. (2013). Gold nanoparticles: an era in bionanotechnology. *Expert Opinion on Drug Delivery, 10(3), 397–409.* doi:10.1517/17425247.2013.749854

9. Menon, S., Rajeshkumar, S., & Kumar, V. (2017). A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 516-527.
10. Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537-556.
11. Dreaden, E. C., Mackey, M. A., Huang, X., Kang, B., & El-Sayed, M. A. (2011). Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3391-3404.
12. Singh P, Pandit S, Mokkapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 6;19(7):1979. doi: 10.3390/ijms19071979
13. Slavin, Y.N.; Asnis, J.; Hafeli, U.O.; Bach, H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnol.* 2017, 15, 65.
14. AuroVist [Electronic resource] access mode: <https://www.nanoprob.es.com/index.html>
15. Aurimmune [Electronic resource] access mode: <https://www.cytimmune.com/tech>
16. Aurion [Electronic resource] access mode: <https://aurion.nl/>
17. Wantai [Electronic resource] access mode: <http://www.ystwt.cn/covid-19>
18. Mikhailova, E. O. (2021). Gold nanoparticles: biosynthesis and potential of biomedical application. *Journal of Functional Biomaterials*, 12(4), 70. <https://doi.org/10.3390/jfb12040070>
19. Javed, R.; Zia, M.; Naz, S.; Aisida, S.O.; Ain, N.; Ao, Q. Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: Recent trends and future prospects. *Nanobiotechnology* 2020, 18, 172
20. Lee JH, Kim YS, Choi TJ, Lee WJ, Kim YT. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 Sep;54(Pt 5):1699-1702. doi: 10.1099/ijms.0.63146-0.
21. ABUBAKAR, HERMAWATY, et al. An orange pigment from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis* SAB E11 as a prospective source of natural antioxidants. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 2022, 23.9.

22. World register of marine species [Electronic resource] access mode: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=396124#sources>
23. Національний канцер-реєстр України(НКРУ). Рак в Україні, 2020-2021. [Електронний ресурс] /Режим доступу: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_23/index.htm
24. Singh P, Pandit S, Mokkapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 6;19(7):1979. doi: 10.3390/ijms19071979.
25. Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR Jr, Gannon WE, Walker M, Seidel GD, Yuldasheva N, Tamarkin L. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res.* 2010 Dec 15;16(24):6139-49. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0978.
26. Cytimmune. New corporate leadership is driving innovation from the lab to the clinic. [Electronic resource] / Access mode: <https://www.cytimmune.com/about>
27. Prakash M., Min-jae K., Niyonizigiye I., Singh A., Kim J. and other/ Yong Extracellular synthesis of gold nanoparticles using the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis* BC74171T and evaluation of their antioxidant activity and antiproliferative effect on normal and cancer cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* №183, 2019. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110455
28. Lab1ST. Microbial Stainless Steel Bioreactors [Electronic resource] / Access mode: <https://www.lab1st.com/microbial-stainless-steel-bioreactor>
29. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
30. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.9:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика»
31. basic cleaning and sanitation-ractices in pharmaceuticals manufacturing [Electronic resource] Access mode: <https://www.gmpsop.com/basic-cleaning-and-sanitation-practices-in-pharmaceuticals-manufacturing/>
32. Wirtanen, G., & Salo, S. (2003). Disinfection in food processing—efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2, 293-306.

33. Pharmaceutical Facility Sanitization: Best Practices Considered [Electronic resource] Access mode: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/184449-Pharmaceutical-Facility-Sanitization-Best-Practices-Considered/>
34. Xu, X., & Cölfen, H. (2021). Ultracentrifugation techniques for the ordering of nanoparticles. *Nanomaterials*, 11(2), 333. **doi: 10.3390/nano11020333**
35. Cherian, T., Maity, D., Rajendra Kumar, R. T., Balasubramani, G., Ragavendran, C., Yalla, S., ... & Peijnenburg, W. J. (2022). Green chemistry based gold nanoparticles synthesis using the marine bacterium *Lysinibacillus odyseeyi* PBCW2 and their multitudinous activities. *Nanomaterials*, 12(17), 2940. **doi: 10.3390/nano12172940**
36. Nail, S. L., Jiang, S., Chongprasert, S., & Knopp, S. A. (2002). Fundamentals of freeze-drying. *Development and manufacture of protein pharmaceuticals*, 281-360. doi: 10.1007/978-1-4615-0549-5_6
37. Madakka, M., Jayaraju, N., & Rajesh, N. (2018). Mycosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. *MethodsX*, 5, 20-29. doi:10.1016/j.mex.2017.12.003
38. Mohammady, M., & Yousefi, G. (2020). Freeze-drying of pharmaceutical and nutraceutical nanoparticles: the effects of formulation and technique parameters on nanoparticles characteristics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(11), 3235-3247.
39. Analytical and Preparative Ultracentrifuges [Electronic resource] / Access mode: <https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/135690-Analytical-and-Preparative-Ultracentrifuges/>
40. Edwards GB, Muthurajan UM, Bowerman S, Luger K. Analytical Ultracentrifugation (AUC): An Overview of the Application of Fluorescence and Absorbance AUC to the Study of Biological Macromolecules. *Curr Protoc Mol Biol*. 2020, 133(1). doi: 10.1002/cpmb.131.
41. Optima XPN-90 Preparative Ultracentrifuge [Electronic resource] / Access mode: <https://bic.nd.edu/instrumentation/preparative-ultracentrifuge/>

- 42.EYELA [Electronic resource] / Access mode: <https://en.sun-way.com.tw/unit-type-freeze-dryer-fdu-2110.html>
- 43.C-RVK решітка повітрязабірні канална для круглих каналів. [Електронний ресурс] /Режим доступу: <https://ccktm.ibud.ua/ua/praisy-companii/226571>
- 44.Промислові фільтри. Фільтруючий матеріал G4 від New Filter [Електронний ресурс] /Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>
- 45.Intertool. Компресори поршневі [Електронний ресурс] /Режим доступу: <https://intertool.ua/catalog/kompressori/kompressori-porshnevie/>
- 46.Hydraulic.UA. Водяной теплообменник ОМТ [Електронний ресурс] /Режим доступу: <https://hydraulic.ua/ru/vodyaniy-teploobminnik-omt-sa080-150-s4-30-80-1-khv/>
- 47.Системакс. ВНВ повітрянагрівач (калорифер) [Електронний ресурс] /Режим доступу: <https://systemax.ua/ua/komplektuyushie/vodjanie-nagrevateli/vnv/vnv-113-201.html>
- 48.Instrumentarium. Фільтр стисненого повітря другого ступеня ОМІ [Електронний ресурс] /Режим доступу: https://instrumentarium.com.ua/katalog/obladnannja/aksesuari/omi-pf-0010-1-2--04a-0060-pg00-h-0000?gclid=Cj0KCQiAnNacBhDvARIsABnDa68Izqx6-DIDK3wOQQxGwXWphn0TcByg98h0luLv9t1i3xM6wN7kisYaAhlqEALw_wcB&gmc=true
- 49.Munro Scientific division. DOUBLE-WALL GLASS REACTOR - 10 LITER. [Electronic resource] / Access mode: <https://www.munroscientific.co.uk/double-wall-glass-reactor-10liter>
- 50.DEBEM.Перистальтичний насос [Електронний ресурс] /Режим доступу: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-3/
- 51.Sartorius. Sartofluor [Electronic resource] / Access mode: https://www.sartorius.com/shop/ww/de/eur/products-process-filtration-and-purification/sartofluor/p/M_Sartofluor

52. FLUID Biosolutions. CARR Centritech VP Pilot [Electronic resource] / Access mode: <https://fluidbiosolutions.com.au/product/carr-centritech-vp-pilot/>
53. Merck. Durapore® Cartridge Filter [Electronic resource] / Access mode: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/mm/cvgl71tp3>
54. AF. FOETH. Stainless Steel Reactor [Electronic resource] / Access mode: <https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/7-ltr-mobile-new-lt003#>
55. Lee JH, Kim YS, Choi TJ, Lee WJ, Kim YT. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Sep;54(Pt 5):1699-1702. doi: 10.1099/ijms.0.63146-0.
56. Hermawaty A., Astuti R.I., Listowati S. and other. An orange pigment from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis* SAB E11 as a prospective source of natural antioxidants. *Biodiversita*, Volume 23, Number 9, Pages: 4730-4737. doi: 10.13057/biodiv/d230940
57. Технології мікробного синтезу лікарських засобів/ Л.М. Буценко, В.О.Красінько. – К.: НУХТ, 2011. – 82 с.
58. El-Batal A. I., Mona S. S., Al Tamie. Biosynthesis of gold nanoparticles using Marine *Streptomyces cyaneus* and their antimicrobial, antioxidant and antitumor (in vitro) activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7(7):1020-1036.
59. MBBR Technology in Wastewater Treatment [Electronic resource] / Access mode: <https://translate.google.com/?hl=ru&sl=en&tl=uk&text=MBBR%20Technology%20in%20Wastewater%20Treatment&op=translate>
60. Biofilm in Moving Bed Biofilm Process for Wastewater Treatment [Electronic resource] / Access mode: <https://www.intechopen.com/chapters/68476>
61. Moving Bed Biofilm Reactor [Electronic resource] / Access mode: <https://www.lenntech.com/processes/mbr.htm>
62. The Ecologix MBBR. Ecologix [Electronic resource] / Access mode: <https://www.ecologixsystems.com/system-mbr/#form-field-name>

63. An Exhausting Solution for Fermentors [Electronic resource] / Access mode:
<https://www.newhorizonbiotech.com/resources/2018/10/24/an-exhausting-solution-for-fermentors>

The bacterial synthesis of AuNPs was performed according to the methodology reported previously [11], with certain modifications. *P. haerundaensis* was inoculated into a 1000-ml conical flask containing 500 ml of MB (pre-sterilized) and incubated at 25 °C for 48 h, on an orbit shaker (100 rpm). After the incubation period, to obtain a cell-free supernatant, the cells were removed by centrifugation at 3500 rpm for 30 min at 4 °C. The extracellular synthesis of AuNPs was performed by using the supernatant obtained. For the synthesis of AuNPs, a typical reaction mixture contained 10 ml of 2 mM chloroauric acid and 10 ml of the supernatant. The reaction was performed at 70 °C for 15 min in a water bath on the magnetic stirrer. The effects of the reaction parameters on AuNP formation were also studied, including temperature (30, 40, 50, 60, and 70 °C), time (3, 6, 9, 12, and 15 min), supernatant concentration (2, 4, 6, 8, and 10 ml), and chloroauric acid concentration (0.25, 0.5, 1, 1.5, and 2 mM). The AuNPs synthesized were separated by high-speed centrifugation at 13,000 rpm for 25 min, washed with sterile distilled water to remove unreacted metal ions or supernatant (cell-free) components, and finally lyophilized to obtain a powder form.

3.2. Characterization of AuNPs

The extracellular synthesis of AuNPs was performed by using optimized parameters (equal volumes of 2 mM chloroauric acid and *P. haeuundaensis* supernatant, 70 °C temperature, and 15 min reaction time) and the AuNPs synthesized were separated by high-speed centrifugation and washed with distilled water to remove unreacted metal ions and other impurities [17]. TEM analyses were used in different studies to characterize the morphology of the green synthesized nanoparticles [8–10]. In this study, Fig. 4(a) reveals the TEM results of the spherical shape of the AuNPs synthesized. Recently, bacterial synthesized polydisperse nanoparticles [22,23] and different shapes of AuNPs have been reported [24,25]. The AuNPs synthesized in the present study ranged from 15 to 35 nm [10,11,17]. However, the AuNPs synthesized using *P. haeuundaensis* is polydisperse in nature, a common issue with green synthesis. Fig. 4(b) reveals PSA, synthesized AuNPs average size 20.93 ± 3.46 nm were observed. The AuNP size range varies with TEM and ELS spectroscopy results are compared due to the fact that ELS measures the hydrodynamic diameter and TEM visualizes the metallic core of the nanoparticles [11,26,27]. The surface charges of nanoparticles were analyzed by zeta potential measurements and observed at -4.26 mV for the AuNPs synthesized (Fig. 5(a)). This indicates that the AuNPs bear negative charge molecules on their surfaces that prevents the aggregation of AuNPs by electrostatic repulsion [12]. Fig. 5(b) shows the EDX spectrum of the AuNPs synthesized. The EDX spectrum obtained on FE-SEM indicates a strong signal peak at 2.15 keV, which corresponds to elemental gold. A similar peak was reported for AuNPs synthesized using *Sporosarcina koreensis* DC4 [17] and *Streptomyces* sp. MBRC-82 [12]. The XRD spectrum of the AuNPs synthesized is shown in Fig. 6(a). The XRD pattern contains four intense peaks in the spectrum of 2θ value ranging from 10 to 80, corresponding to AuNPs and these patterns were similar to Bragg's reflection [17]. These findings were in good agreement with previous studies on AuNP synthesis using *No-*

The genus *Paracoccus* consists of Gram-negative, oxidase- and catalase-positive bacteria that show substantial metabolic versatility. At present, the genus *Paracoccus* includes 17 recognized species. Phylogenetically, the genus belongs to the α -3 subclass of the *Proteobacteria*. In this study, results of a taxonomic study and a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons are described. Data show that a newly isolated marine strain, BC74171^T, should be classified as a representative of a novel species within the genus *Paracoccus*. The name *Paracoccus haeundaensis* sp. nov. is proposed; the type strain is BC74171^T (=KCCM 10460^T=LMG P-21903^T) and its characteristics are described.

An orange-pigmented, astaxanthin-producing bacterial strain, BC74171^T, was isolated from sea water collected on the Haeundae Coast, Korea. This strain was isolated on nutrient agar medium (Difco) and maintained on PPES-II medium (0.2 % polypeptone, 0.1 % Bacto-yeast extract, 0.1 % Bacto-soytone, 0.1 % Bacto-tryptone, 10 p.p.m. ferric citrate and 3 % NaCl) by serial inoculation. Strain BC74171^T was Gram-negative and rod-shaped. The cells ranged from 0.3 to 0.7 μm in diameter and 0.8 to 2.5 μm in length. Cells were non-motile and non-spore-forming. Colonies on agar were smooth, flat and bright orange in colour.

Gram-negative, non-motile, rod-shaped and non-spore-forming. Cells are 0.3–0.7 μm in diameter and 0.8–2.5 μm in length. Colonies are orange to red in colour. Optimal growth temperature is 25 °C; no growth occurs below 10 °C or above 40 °C. The optimum NaCl concentration for growth is 1–6 % (w/v). No growth occurs in the presence of more than 8 % (w/v) NaCl. Optimal pH for growth is 8. Capable of producing astaxanthin. The major cellular non-hydroxyl fatty acid is unsaturated C_{18:1}. The major hydroxyl fatty acid is C_{10:0} 3-OH. The following carbon and energy sources can be used for growth: D-arabinose and galactose. No growth occurs on D-glucose, lactose, maltose, sucrose, trehalose, D-mannitol, D-sorbitol, inositol, D-raffinose, D-fructose, D-mannose, dimethylformamide, L-glutamic acid, acetone, L-leucine, L-asparagine, L-rhamnose, salicin, D-cellobiose, adonitol, dulcitol, D-xylose or glycerol. L-Ornithine and L-lysine decarboxylases, and arginine dihydrolase are not detected. Citrate utilization test is
