

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

(підпис) **Наталія ГРЕГІРЧАК**
(прізвище та ініціали)

(підпис) **Віктор СТАБНИКОВ**
(прізвище та ініціали)

«__» __ лютого __ 2022р.

«__» __ лютого __ 2022р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Поверхнево-активні софороліпіди мікробного походження

Виконав: здобувач II курсу, групи 02

ЗВАРИЧ Анна Олегівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____
ПИРОГ Тетяна Павлівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент _____
Юлія ПАСІЧНИК
(імя та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ біотехнології і мікробіології
_____ Віктор СТАБНІКОВ
“03” _____ листопада _____ 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

_____ ЗВАРИЧ Анни Олегівної

(прізвище, ім'я, по батькові)

- Тема роботи Поверхнево-активні софороліпіди мікробного походження
керівник роботи _____ ПИРОГ Тетяна Павлівна, проф., д.б.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом вищого навчального закладу від «02» листопада 2021 року № 863-к
- Строк подання здобувачем роботи _____ 1 лютого 2022 року
- Вихідні дані до роботи _____ об'єм ферментера 300 л, коефіцієнт заповнення 0,6
- Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) _____ техніко-економічне обґрунтування, опис технологічної схеми, контроль виробництва _____
- Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)
Технологічна схема виробництва – аркуш формату А1 та А2. Апаратурна схема виробництва – 2 аркуші формату А1.
- Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання_ __3 листопада 2021 року__

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1.	Літературний огляд	03.11.2021 – 17.11.2021	
2.	Техніко-економічне обґрунтування	18.11.2021 – 25.11.2021	
3.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	26.11.2021- 10.12.2021	
4.	Обґрунтування виділення та очищення софороліпідів	13.12.2021- 20.12.2021	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання крему	21.12.2021- 28.12.2021	
6.	Специфікація обладнання	29.12.2021 – 5.01.2022	
7.	Опис технологічної схеми виробництва	6.01.2022- 10.01.2022	
8.	Контроль виробництва софороліпідів	11.01.2022 – 15.01.2022	
9.	Контроль готового продукту	16.01.2022- 20.01.2022	
10.	Оформлення пояснювальної записки	20.01.2022- 24.01.2022	
11.	Виконання графічної частину проекту	25.01.2022- 01.02.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Анна ЗВАРИЧ
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна ПИРОГ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

В даній кваліфікаційній роботі висвітлено проект отримання софороліпідів при культивуванні *Starmerella bombicola* NBRC 10243, виділення та очищення даних поверхнево-активних речовин для одержання сухої порошкоподібної субстанції, що використовується для виготовлення зволожуючого крему.

Технологічна схема одержання крему зволожуючого з софороліпідами складається з біосинтезу софороліпідів (приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу на 3 етапах та виробничий біосинтез), виділення софороліпідів та їх очистки (відділення біомаси методом сепарування, виділення основного цільового продукту методом екстракції (етилацетатом та ізопропанолом), очистка поверхнево-активних речовин від залишків олії промиванням гексаном та осадженням на сорбенті з наступною елюцією ацетонітрилом, концентрування вакуум-випарюванням, сушіння та подрібнення) та безпосереднє одержання емульсійного крему (підготовка компонентів, емульгування, охолодження, гомогенізація, фасування та пакування), що наведені в апаратурній та технологічних схемах. Отримані софороліпіди контролювали такими методами контролю: високоефективна рідинна хроматографія з подальшим використанням та маспектрометрії, також вимірювання поверхневого натягу та емульгувальних властивостей.

Кваліфікаційна робота складається з 114 стр. друкованого тексту, містить 17 таблиць, 17 рисунків. Пояснювальна записка складається зі вступу, п'яти розділів, списку використаної літератури (76 джерел) та графічної частини (1 креслення в форматі A2 та 3 креслення в форматі A1).

Ключові слова: *софороліпіди, поверхнево-активні речовини, біосинтез, виділення, емульсійний крем, зволожуючі властивості.*

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	8
РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ СОФОРОЛІПІДІВ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В КОСТЕМОЛОГІЇ.....	8
1.1. Шляхи інтенсифікації синтезу софороліпідів	8
1.1.1. Біосинтез софороліпідів	8
1.1.2. Оптимізація умов культивування продуцентів.....	14
1.1.3. Генноінженерні штами мікроорганізмів – продуценти софороліпідів..	14
1.2. Біологічна активність софороліпідів	16
1.2.1. Антимікробні властивості.....	16
1.2.2. Антифунгальні властивості.....	24
1.2.3. Деструкція біоплівки	27
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	28
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	28
2.1. Передумови виробництва ЛЗ.	28
2.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	29
2.3. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ	31
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ	37
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування.....	37
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера	44
3.3. Обґрунтування стадій виділення та очищення субстанції для виробництва готового продукту	48
3.4. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання готового продукту.	64

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	70
4.1. Специфікація обладнання	70
4.2. Опис технологічної схеми	77
РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	95
5.1. Контроль виробничого біосинтезу	95
5.1.1. Мікробіологічний контроль	95
5.1.2. Показники росту і синтезу	96
5.2. Контроль виділення та очищення софороліпідів	97
5.3. Показники якості при стандартизації кремів косметичних	102
ВИСНОВКИ	104
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	106

ВСТУП

Поверхнево-активні речовини, софороліпіди отримують ферментаційним способом завдяки таким мікроорганізмам, як наприклад, *Starmerella bombicola*.

Відомо, що софороліпіди володіють найрізноманітнішими функціями і використовуються як емульгатори, піноутворювачі, солюбілізатори, зволожуючі та миючі засоби та мають біологічну активність, яка використовується в якості активних інгредієнтів в косметичці. Багатофункціональні біологічні поверхнево-активні речовини, такі як софороліпіди мають кілька косметичних застосувань [1] та доведено, що софороліпіди мають хорошу сумісність зі шкірою і відмінні зволожуючі властивості [1].

Софороліпіди комерційно виробляються, як зволожувачі компоненти, і присутні в косметичці «Sofina» та «Soliance», які виробляються для нанесення на шкіру та містять як активний інгредієнт „Sopholiance S“. Софороліпіди також присутні в рум'янах, губних помадах у формі олівця, кремах для губ і тінях для повік [1].

Але, незважаючи на успішне застосування мікробних софороліпідів в світовій косметології досі використовуються софороліпіди хімічного походження, як наприклад в лінійці догляду за шкірою обличчя «Lactoferrin Lab». Проте, близько 50% хімічних поверхнево-активних речовин на ринку мають нафтохімічне походження і тому отримуються з нестійких ресурсів. Хоча ці хімічні поверхнево-активні речовини надзвичайно ефективні у рецептурах, припускають, що вони можуть бути шкідливими для шкіри. Їх тривале використання та висока концентрація можуть спричинити солюбілізацію епідерми та внутрішньоклітинних ліпідів, таким чином,

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.	Зварич А.О.				ВСТУП				Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.	Пирог Т.П.										6	2
Реценз.	Пасічник Ю.В.											
Н. Контр.												
Затверд.	Пирог Т.П.											
					Кафедра БТМ							

впливаючи на структурну цілісність та бар'єрні функції шкіри. З цих причин виникає поштовх для заміни хімічних поверхнево-активних речовин іншими сполуками [2].

Тому метою даної кваліфікаційної роботи є заміна синтетичних софороліпідів на софороліпиди мікробного походження в кремні зволожуючому.

Новизна роботи - сучасний метод очищення софороліпідів для подальшого використання в доглядовій косметичці, який полягає у зв'язуванні софороліпідів на сорбенті Strata C18 (сорбент на основі кремнезему), що забезпечує вилучення гідрофобно-гідрофільних молекул цільового продукту з водних матриць з наступною їх елюцією ацетонітрилом.

Дана кваліфікаційна робота присвячена проекту біосинтезу поверхнево-активних речовин за допомогою *Starmerella bombicola* NBRC 10243, виділення та очищення софороліпідів з культуральної рідини у вигляді сухої порошкоподібної субстанції для подальшого використання в косметичних засобах, зокрема кремах.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ СОФОРОЛІПІДІВ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В КОСТЕМОЛОГІЇ

В останні роки комерційний інтерес до поверхнево-активних речовин, зокрема софороліпідів зростає. Вони активно використовуються в миючих засобах, засобах особистого догляду та косметичі, перспективним є використання софороліпідів в медицині. Такий попит на даний продукт породжує інтерес до біотехнології його одержання, а також до біологічних властивостей софороліпідів.

Мета даного огляду – розглянути шляхи інтенсифікації синтезу софороліпідів мікроорганізмами, проаналізувати які можливості для біотехнології софороліпідів відкриває генна інженерія та штами-мутанти, описати біологічні властивості (антимікробні, антифунгальні властивості, здатність до деструкції біоплівки) даних поверхнево-активних речовин біологічного походження.

1.1. Шляхи інтенсифікації синтезу софороліпідів

1.1.1. Біосинтез софороліпідів

Перший опис біосинтезу софороліпідів датовано 1982 р. це робота Ito та Inoue [1]. *Torulopsis bombicola* ATCC 22214 здатна виробляти позаклітинні софороліпіди, при вирощуванні на простому середовищі такого складу: глюкоза (100 г/л), дріжджовий екстракт (5 г/л) та соняшникова олія (100 г/л) [1]. В даній роботі висвітлювалось припущення про здатність софороліпідів впливати на дисиміляцію алканів.

Роботи останніх років сфокусовані на підвищенні синтезу софороліпідів та вивчені їхніх властивостей. В роботі [2] 2010 р. автори при культивуванні

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ СОФОРОЛІПІДІВ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В КОСТЕМОЛОГІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Зварич А.О.						8	21
Перевір.	Пирог Т.П.							
Реценз.	Пасічник Ю.В.							
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ		

Starmerella bombicola на середовищі з м'яса отримують 22 г/л кислих та лактонних форм софороліпідів. Проте, в роботах наступних років [3-7] автори змогли досягти в 2-3 рази вищого синтезу софороліпідів за рахунок додавання другого джерела вуглецю – рослинної олії. Так, в роботі Imura зі співавт. [6] 2013 року на середовищі з глюкози (50 г/л) та соняшникової олії (100 г/л) отримали 120 г/л суміші кислих та лактонних форм софороліпідів.

Молочнокислі бактерії теж здатні до синтезу софороліпідів, так в роботі [8] 2010 р. вказані дані про синтез 50 г/л софороліпідів за культивування лактобацил.

Можливе культивування мікроорганізмів для отримання виключно кислих форм софороліпідів, так Konishi в роботі [9] 2017 р. вдалось отримати лише кислі форми, але в достатньо малій кількості – 3,5 г/л. Проте уже в 2018 році [10] у цього ж автора за рахунок додавання в середовище культивування естеру алкілу C₁₈ вихід кислих форм виріс до 22 г/л.

Дані щодо особливостей культивування продуцентів софороліпідів наведені в узагальнювальній таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Біосинтез софороліпідів

Штам- продуцент	Склад поживного середовища, на 1 л	Концент рація ПАР, г/л	Склад ПАР	Особливості процесу	Література
<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Середовище з меляси з загальним цукром 150 г, що приготоване: 550 г сахарози та 50 г фруктози (або глюкози) + 3 об'єми води	22,8	Суміш кислої та лактонної форми C _{16:0} – 6,3% (кисла) C _{18:0} – 36,8% (кисла) C _{18:1} – 54,7% (лактонна) Інші – 2,2% Головним продуктом вважається софороліпід лактонної форми	Ферментер 5 л 25 °С 600об/хв рН 6 рівень рН регулюється подачею NaOH та HCl 120 год	2
<i>Lachancea thermotolerans</i> BBMCZ7FA20	Глюкоза – 100г; Дріжджовий екстракт – 10 г; Сечовина – 1 г; Олія ріпаку – 100г; Дистильована вода	24,2	Кислі та лактонні форми (співвідношення відсутнє)	Колби 250 мл заповнені на 100 мл 30 °С 200 об/хв. 264 год	11
<i>Starmerella bombicola</i> MTCC 1910	Глюкоза – 100 г; соняшникова олія – 100г; дріжджовий екстракт – 4г; сечовина – 0,6 г	38,6	Вільні кислоти та лактонні форми (співвідношення відсутнє)	Колби 500 мл заповнені на 100 мл 30 °С 170 об/хв. рН 6 168 годин	3

Продовження таблиці 1.1.

<i>Starmerella bombicola</i> NRRL Y - 17069	Гліцерол – 100 г; дріжджовий екстракт – 10г; сечовина – 1 г; олеїнова кислота – 100 г (додається після 48 год культивування)	52,34	Кислі та лактонні форми: C _{16:0} – 15,23% (кисла) C _{18:0} – 5,12% (кисла) C _{18:1} – 65,23% (лактонна) C _{18:2} – 10,65% (лактонна)	Ферментер 5 л, заповнений на 2 л 25 °С 200 об/хв. Відсутня регуляція рН 192 днів	4
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Глюкоза – 100г; Дріжджовий екстракт – 5г; KH ₂ PO ₄ – 1г; CaCl ₂ · 2 H ₂ O – 0,1 г; NaCl – 0,1 г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г; пептон – 0,7г; кососова олія – 100г	54	Кислі та лактонні форми: C ₈ – 3,01% (кисла) C ₁₀ – 4,47% (кисла) C ₁₂ – 53,27% (кисла) C ₁₄ – 21,54% (кисла) C ₁₆ – 9,51% (кисла) C _{18:1} – 8,20% (лактонна)	Ферментер 30 л (заповнення на 15 л) 30 °С 550 об/хв рН 3,5, автоматична регуляція рН за допомогою NaOH 192 днів	12
<i>Lactobacillus paracasei</i> (авторами штам не вказано)	Декстроза – 20г; М'ясний екстракт – 8г; Дріжджовий екстракт – 4г; Цитрат амонія – 2г; MgSO ₄ – 0,2г; Пептон – 10г; Ацетат натрію – 5г; K ₂ HPO ₄ – 2г; MnSO ₄ – 0,05г	50	Інформація не наведена	Колби 37 °С 120 об/хв рН 7 72 год	8

Продовження таблиці 1.1.

<i>Candida floricola</i> ZM 1502	Гліцерол – 200г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г; Na ₂ SO ₄ – 4г; NH ₄ NO ₂ – 1г; KH ₂ PO ₄ – 0,5 г; Дріжджовий екстракт – 1г; Стрептоміцин – 0,05г; Хлорамфенікол – 0,05 г	3,5	Лише кислі форми	Колби 26 °С 150 об/хв. рН 7 168 год	9
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> var. soforolipid CGMCC 1576	Глюкоза – 80г; Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O – 1г; KH ₂ PO ₄ – 1 г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г; Олеїнова кислота – 60г; NH ₄ NO ₃ – 2г	68	12% - лактонні форми, 88% - кислі форми	Колби 300 мл заповнені на 50мл 30 °С 200 об/хв. рН 3,5 168 год	13
<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Глюкоза – 25г; Оливкова олія – 50г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г; NaNO ₃ – 3г; KH ₂ PO ₄ – 0,5 г; Дріжджовий екстракт – 1г	49,2	Кислі та лактонні форми (співвідношення не наведено)	Ферментер 28 °С 500 об/хв. рН 5 168 год	5
<i>Candida floricola</i> ZM 1502	Гліцерол – 200 г; Сечовина – 6г; KH ₂ PO ₄ – 12 г; Дріжджовий екстракт – 2г; K ₂ HPO ₄ – 2г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 1,5 г; Естер алкілу C ₁₈ – 50 г	22,6	Лише кислі форми	Ферментер 28 °С 800 об/хв. Без контролю рН 168 год	10

Закінчення таблиці 1.1.

<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Олія ятрофи – 100 г; Глюкоза- 50 г; Дріжджовий екстракт – 3г; Сечовина – 1г; NaCl – 0,1 г; KH ₂ PO ₄ – 1 г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г;	122,6	Кислі та лактонні форми (співвідношення не наведено)	5 л ферментер 25 °С 500 об/хв. рН 7 168 год	6
<i>Candida bombicola</i> F 6.5	Глюкоза- 100 г; KH ₂ PO ₄ – 1 г; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4г; Кукурудзяний розчин – 10г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г;	230,8	Кислі та лактонні форми (співвідношення не наведено)	5 л ферментер 25 °С рН 3,5 168 год	14
<i>Starmerella bombicola</i> CGMCC 1576	Глюкоза- 60 г; Олеїнова олія – 60г; Дріжджовий екстракт – 3г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г; KH ₂ PO ₄ – 1 г; Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O – 1г;	60	40% - лактонні форми 60% - кислі форми	2 л колба з робочим об'ємом 800 мл 30 °С 200 об/хв 168 год	7

1.1.2. Оптимізація умов культивування продуцентів

Оптимізація умов культивування продуцентів важливе питання, як для інтенсифікації синтезу, так і для здешевлення виробництва.

Так в літературному огляді 2007 року [29] оптимальною температурою для культивування *S. bombicola* ATCC 22214 (один з основних продуцентів софороліпідів) є 28,8 °C.

Класичним складом поживного середовища вважається глюкоза, дріжджовий автолізат та сечовина. Збільшити вихід софороліпідів можливо поетапним додаванням гідрофобного джерела вуглецю [29].

Зазвичай на виробництві поверхнево-активних речовин 10-30% від загальних витрат припадає саме вартість субстрату. Цю вартість можна знизити використавши наприклад в рази дешевше середовище на основі гліцерину [30] або є можливість здешевлення субстрату використовуючи вторинну сировину – олію після смаження (цей спосіб вважається екологічним, що цінується в цілому світі) [31]. Таким чином можна задовольняти ринок повторно використовуючи ресурси при цьому знижуючи вартість виробництва.

1.1.3. Генноінженерні штами мікроорганізмів – продуценти софороліпідів

Софороліпіди – це перспективні поверхнево-активні речовини або миючі засоби, які знаходять широке застосування в побутовій хімії особистому догляді та косметичі. Незважаючи на комерційний інтерес, біосинтетичний шлях цих вторинних метаболітів був частково нерозкритим. Проте, у 2013 році [15] представлено кластер генів софороліпідів, що складається з п'яти генів, які беруть участь у синтезі софороліпідів: монооксигеназа цитохрому P₄₅₀, дві глюкозилтрансферази, ацетилтрансфераза та транспортер. В даній роботі продемонстровано, що відключення першого кроку біосинтетичного шляху, за який відповідає цитохром P₄₅₀ монооксигеназа, - термінального або субтермінального гідроксилювання загальної жирної кислоти – приводить до повного припинення виробництва софороліпідів. Також доведено, що вибиття

транспортного гена призводить до появи мутантів, що мають здатність продукувати лише 10% від нормальної кількості продукованих софороліпідів, що вказує на альтернативні шляхи біосинтезу [15].

Нарешті, було доведено, що перешкодження виробленню софороліпідів не впливає на життєздатність клітини, що і можна було очікувати від вторинного метаболіта [15].

За допомогою штамів мутантів можна вирішити таке важливе питання, як інтенсифікація процесу продукування софороліпідів. Так в 2012 році [16] за допомогою імплантації пучка іонів азоту з низькою енергією та штаму *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576, що здатний до синтезу софороліпідів, було одержано 18 штамів-мутантів, один з яких підвищив здатність продукувати софоро ліпіди до 104 г/л, що вище ніж в дикому штамі на 84,71%, а також цей показник підвищується при масштабуванні, наприклад в біореактор об'ємом 5 л, де становить 135 г/л.

Також під час експерименту в інших штамів-мутантів окрім інтенсифікації синтезу була помічена здатність синтезувати специфічні софоро ліпіди. Такі софороліпіди необхідні для медицини та косметології, тож дослідження даної проблематики актуальне [16].

Софороліпіди непатогенних дріжджів *Candida bombicola* використовуються як біодеградабельні, екологічні поверхнево-активні речовини.

Ацетилювання молекул софороліпідів є важливим параметром, що впливає на солюбілізацію, поверхневий натяг та біологічні властивості. Повністю неацетильовані софороліпіди не можуть утворитися під час класичного культивування.

В даній роботі [17] знайдено ген ацетил трансферазу АТ, що відповідає за ацетилювання синтезованих софороліпідів *C. bombicola*. Створивши мутант без

даного гена, було отримано виробництво неацетильованих софороліпідів $5 \pm 0,7$ г/л, використовуючи рапсову олію, як гідрофобне джерело вуглецю.

Залежно від застосування залишається потреба у тому, щоб маніпулювати природним співвідношенням кислих та лактонних форм софороліпідів. В роботі 2015 року [18] повідомляється про фермент, відповідальний за лак тонізацію софороліпідів. Відкриття гена, що кодує цю лактонову естеразу (eble) дозволило розробити перспективні штами *S. Bombicola*, що продукують або виключно лактонні (з використання штаму надмірної експресії eble), або виключно кислі (з використанням штаму делеції eble, Δ eble). Штами-мутанти показують високу продуктивність, на рівні з дикими штамами. Необхідно звернути увагу, на те, що регулюючий вплив цитрату, що характерний для початкового штаму, відсутній у штаммах-мутантах, що доводить його вище надійність, та підтверджує можливість промислового виробництва [18].

1.2. Біологічна активність софороліпідів

1.2.1. Антимікробні властивості

В додаток до викладених вище позитивних та важливих функцій мікробних поверхнево-активних речовин в 2004р в роботі Singh та ін. [19] показано здатність софороліпідів до антибактеріальних, антифунгальних властивостей та до руйнування біоплівки.

Антибактеріальна активність є ледь не найважливішою властивістю софороліпідів, тому науковці світу не оминули цю тему в своїх дослідженнях.

Як зазначається в роботі 2013 р. [20] софороліпіди невизначеного складу інгібували ріст *Escherichia coli* ATCC 8739 при внесенні в кількості 1мг/л, а *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 всього при 0,3 мг/л.

Софороліпіди, що є продуктом синтезу молочнокислих бактерій *Lactobacillus paracasei* [8] проявили високу антибактеріальну активність проти *S.aureus* та *Staphylococcus epidermiolis*, MIC (мінімальна інгібуюча концентрація) становила 6,25 г/л, та дещо нижчу активність проти *E.coli* та *Pseudomonas aeruginosa* – більше 25 мг/л.

В 2016 році науковцями показано чудові результати щодо антибактеріальної активності *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15 [21]. Проти основних патогенів мінімальні інгібуючі концентрації становили менше 1 мг, а зона затримки росту – 11-20 мм.

Якщо говорити про софоро ліпіди лише лактонної форми, то в роботі [22] показано, що проти патогенів роду *Streptococcus* все ж достатньо низька активність (МІС 97,5-195 мг), що підтверджує те, що кислі форми відповідають за антимікробну властивість.

Узагальнюючі дані про дослідження антибактеріальних властивостей наведені в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

Антибактеріальна активність софороліпідів синтезованих мікроорганізмами

Штам-продуцент	Культивування		Склад софороліпідів	Тест-культура	Антибактеріальна активність			Література
	Склад поживного середовища	Особливості культивування			МІС*, мг/мл	Зона затримки росту, мм	Інгібування росту, %	
<i>Starmarella bombicola</i> lactone esterase overexpression strain (oesble)	Глюкоза – 100 г; Висушені кукурудзяні висівки – 5 г; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4 г; K ₂ HPO ₄ – 1 г; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5 г; Ріпакова олія – 12 г.	Ферментер 150 л (заповнений на 60 л), після 20 год ферментації додається 0,8 г/год ріпакової олії. За допомогою підживлюючого розчину глюкози, її концентрації завжди на рівні 30-50 г/л; 260 год 25 °C; pH 3-5.	Софороліпіди лактонної форми	<i>Streptococcus mutans</i> DSM-20523	195	Не вивчалось	99	22
				<i>Streptococcus oralis</i> DSM-20627	97,5	Не вивчалось	99	
				<i>Streptococcus sanguinis</i> NCTC-7863	195	Не вивчалось	99	
				<i>Actinomyces naeslundii</i> DSM-43013	97,5	Не вивчалось	99	
				<i>Neisseria mucosa</i> DSM-4631	195	Не вивчалось	99	
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Глюкоза – 100 г; мальтози екстракт – 3 г; дріжджовий екстракт – 3 г; пептон – 5 г.	Колби ; 30 °C; 96 год	На 75% складається з лактонних форм та на 25% з кислих	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	Не вивчалось	18	20
				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737	0,3	Не вивчалось	60	

Продовження таблиці 1.2.

<i>Lactobacillus paracasei</i> (авторами штам не вказано)**	Декстроза – 20г; М'ясний екстракт – 8г; Дріжджовий екстракт – 4г; Цитрат амонія – 2г; MgSO ₄ – 0,2г; Пептон – 10г; Ацетат натрію – 5г; K ₂ HPO ₄ – 2г; MnSO ₄ – 0,05г	Колби 37 °С 120 об/хв рН 7 72 год	Авторами інформація не зазначається	<i>Escherichia coli</i> **	>25	Не вивчалось	10	8
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	>25	Не вивчалось	18	
				<i>Staphylococcus aureus</i> **	6,25	Не вивчалось	70	
				<i>Staphylococcus epidermidis</i> **	6,25	Не вивчалось	60	
				<i>Streptococcus agalactiae</i> **	12,5	Не вивчалось	60	
				<i>Streptococcus pyogenes</i> **	25	Не вивчалось	40	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> SBPS 15	Глюкозно-сольове середовище	Ферментер 3 л, заповнений на 2 л; 37 °С; рН 8; 96 год.	Авторами інформація не зазначається	<i>Escherichia coli</i> **	0,012	20	Не вивчалось	21
				<i>Salmonella paratyphi</i> **	0,032	13	Не вивчалось	
				<i>Klebsiella pneumoniae</i> **	0,004	23	Не вивчалось	
				<i>Vibrio cholerae</i> **	0,064	18	Не вивчалось	
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	0,032	20	Не вивчалось	
				<i>Bacillus subtilis</i> **	0,048	15	Не вивчалось	
				<i>Staphylococcus aureus</i> **	0,012	11	Не вивчалось	

Закінчення таблиці 1.2.

<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Глюкоза – 100г; Дріжджовий автолізат – 10г; Сечовина -1г.	Рапсова олія в- стовувалась як вторинне джерело вуглецю	Кислі та лактонні форми	<i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17699	1,6	Не вивчалось	99%	33
				<i>Bacillus subtilis</i> BBK006	1,6	Не вивчалось	99%	

* МІС – мінімальна інгібуюча концентрація, мг/мл

**Авторами штами не конкретизуються

Вітчизняними вченими проводиться мізерна кількість досліджень присвячених біосинтезу та вивченню властивостей мікробних софороліпідів.

В Україні даними дослідженнями займається Янева Ольга [27, 28]. В даних дослідженнях вивчається продукування біологічно-активних софороліпідів дріжджами роду *Candida* на середовищах з різним складом, а також визначається антимікробна активність проти грам позитивних та грам негативних бактерій.

В 2013 році в роботі Ольги Яневої [27] присутня інформація про Біосурфактанти, які утворювали штами *Candida* sp.79a та 156a, були екстраговані етилацетатом та представлені як суміш гліколіпідів за допомогою тонкошарової хроматографії.

В роботі 2019 року [28] штами дріжджів ідентифіковані як *Candida gropengiesseri* 79a та *Candida bombicola* 156a відповідно культивували на середовищах такого складу : 100 г/л глюкози, 1,5 г/л дріжджового екстракту, 4 г/л NH_4Cl , 1 г/л KH_2PO_4 , 0,1 г/л NaCl та 0,5 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. В одному варіанті до поживного середовища додали гідрофобне джерело вуглецю – соняшникову олію (5%), що призвело до підвищення синтезу софороліпідів більш ніж в 5 разів, при цьому поверхневий натяг не змінився.

Таблиця 1.3

Продукування софороліпідів дріжджами штамів *C. gropengiesseri* 79a та *C. bombicola* 156a [28]

Штам-продуцент	Стандартне середовище		Середовище з додаванням соняшникової олії (5%)	
	Концентрація софороліпідів, г/л	Поверхневий натяг, mN/m	Концентрація софороліпідів, г/л	Поверхневий натяг, mN/m
<i>C. gropengiesseri</i> 79a	2.03	36.6	10.65	32.3
<i>C. bombicola</i> 156a	2.87	36	16.11	33.5

Було показано, що біоповерхнево-активні речовини, вироблені вибраними штамми дріжджів здатні зберігати стійкість при високих температурах до 100 °С, а деякі і при 120 °С. Софороліпіди також були стабільними при високі концентрації хлориду натрію (2–10%), проте швидко втрачали стабільність при підвищенні рН.

В даній роботі дослідниками було встановлено мінімальні інгібуючі концентрації екстракту софороліпідів продукованих дріжджами по відношенню до ряду мікроорганізмів. Так, слабкий інгібуючий ефект спостерігався проти грампозитивних штамів бактерій *Bacillus subtilis* UCMВ-901, мінімальна інгібуюча концентрація проти яких становила 1 г/л. Проти мікроорганізмів *Bacillus pumilus* В-913, *Stapylococcus aureus* UCM В-4001 та *Bacillus cereus* UCM В-908 МІС в середньому мінімальні інгібуючі концентрації становили 500мг/л. Найчутливішим бактеріальним штамом по відношенню до софороліпідів синтезованих дріжджами є *Micrococcus luteus* UCM Ас-634, МІС обох випробуваних екстрактів біосурфактанту в даному випадку становила 100 мг/л.

Таблиця 1.4

Антимікробна активність софороліпідів [28]

Штам- продуцент	Мінімальні інгібуючі концентрації екстракту софороліпідів, мг/л				
	<i>M. luteus</i> Ас-634	<i>B. pumilus</i> В-913	<i>S. aureus</i> В-4001	<i>B. cereus</i> В- 908	<i>B. subtilis</i> В-901
<i>C. gropengiesseri</i> 79a	100	800	800	400	1000
<i>C. bombicola</i> 156a	100	200	400	200	1000

Підсумовуючи, автор зазначає, що два штамми дріжджів *C. gropengiesseri* та *C. bombicola*, ізольовані з квіткових рослин, продукують гліколіпідні біосурфактанти - софороліпіди, стабільні за високої солоності середовища та температури, проте зі слабкою антимікробною активністю проти грам-

позитивних бактерій. Поверхнево-активні властивості досліджених штамів вказують на їх потенціал як продуцентів софороліпідів.

Зважаючи на хороші антибактеріальні показники софороліпідів в 2013 році [32] Joshi-Navere разом з Prabhune вирішили спробувати подолати проблему стійкості до антибіотиків за допомогою софороліпідів. Для експерименту було одержано софороліпіди *C. bombicola* ATCC 22214, на середовищі, де джерелом вуглецю є глюкоза.

Проти золотистого стафілокока *S. aureus* ATCC 29737 комбінація тетрацикліну з софоро ліпідом досягла повного інгібування на четверту годину експерименту, в той час як тетрациклін окремо не зміг досягти повного інгібування на 6 год.

Також інгібування *E. coli* ATCC 8739 за застосування комбінації було на 25% ефективніше ніж застосування лише антибіотика. Дані висновки потребують додаткових досліджень, але дають шанс до розв'язання проблеми резистентності антибіотиків.

1.2.2. Антифунгальні властивості

Після дослідження антимікробних властивостей наступним важливим етапом є аналіз антифунгальних властивостей.

Софороліпіди, що синтезуються *Rhodotorula babjevae* YS3 [23] пригнічують ріст *Colletotrichum gloeosporioides* ITCC 6434 уже при 62 мкг/л, а *Corynesporo cassiicola* ITCC 6748 більше ніж за 2000 мкг/л.

Висока антифунгальна активність показана в роботі 2016 р. [21], де софороліпіди невизначеного складу продуковані *S. saprophyticus* SBPS 15 інгібують ріст грибів *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* при 16-32 мкг/л.

Інгібування росту міцелію софороліпідами *Wickerhamiella domercqiae* Y2a [24] проти основних патогенних грибів становить 60-80%, при цьому інгібування росту міцелію становить 30-40%.

Узагальнюючі дані про дослідження антифунгальних властивостей наведені в таблиці 1.5.

Антифунгальна активність софороліпідів синтезованих мікроорганізмами

Штам-продуцент	Культивування		Склад софороліпідів	Тест-культура	Антифунгальна активність				Література
	Склад поживного середовища	Особливості культивування			МІС, мкг/мл	Зона затримки росту, мм	Інгібування росту міцелію, %	Інгібування спорового забруднення, %	
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> Y2a	Дріжджовий екстракт – 3 г; Глюкоза – 80 г; KH ₂ PO ₄ – 1 г; Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O - 1 г; Олеїнова кислота – 60 г; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5 г.	Колби; рН 6,5; 30 °С; 144 год.	Кислі та лактонні форми (співвідношення не наведено)	<i>Pyricularia oryzae</i> AX 1105	Не вивчалось	Не вивчалось	64(89)*	51(90)**	24
				<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn	Не вивчалось	Не вивчалось	79(87)*	47(89)**	
				<i>Fusarium oxysporum</i> ACCC 36468	Не вивчалось	Не вивчалось	61(69)*	30(46)**	
				<i>Fusarium concentricum</i> Nirenberg ang O'Donnell	Не вивчалось	Не вивчалось	61(68)*	38(77)**	
				<i>Phytophthora</i> <i>intestans</i> (Mont.) de Bary	Не вивчалось	Не вивчалось	69(74)*	37(80)**	
				<i>Fusarium</i> sp. ACCC 36194	Не вивчалось	Не вивчалось	62(71)*	29(53)**	
				<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Не вивчалось	Не вивчалось	55(73)*	25(49)**	

Закінчення таблиці 1.5.

<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	Дріжджовий екстракт – 10 г; пептон – 20 г; декстроза – 20 г.	Колби; 19 °С; 72 год.	Кислі та лактонні форми (співвідношення не наведено)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ITCC 6434	62	Не вивчалось	Не вивчалось	Не вивчалось	23
				<i>Fusarium verticillioides</i> MTCC 10556	125	Не вивчалось	Не вивчалось	Не вивчалось	
				<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.pisi. ITCC 4814	125	Не вивчалось	Не вивчалось	Не вивчалось	
				<i>Corynesporo cassicola</i> ITCC 6748	>2000	Не вивчалось	Не вивчалось	Не вивчалось	
				<i>Trichophyton rubrum</i> MTCC 8477	1000	Не вивчалось	Не вивчалось	Не вивчалось	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> SBPS 15	Глюкозно-сольове середовище	Ферментер 3 л, заповнений на 2 л; 37 °С; pH 8; 96 год.	Авторами інформація не зазначається	<i>Aspergillus niger</i>	16	15	Не вивчалось	Не вивчалось	21
				<i>Candida albicans</i>	32	21	Не вивчалось	Не вивчалось	
				<i>Cryptococcus neoformans</i>	32	22	Не вивчалось	Не вивчалось	

* - інгібування росту міцелію вивчалось за концентрації софороліпідів 1(10) г/л; ** - інгібування спорового забруднення за концентрації софороліпідів 1(10) г/л;

1.2.3. Деструкція біоплівок

Деструкція біоплівки під дією софороліпідів аналізується в роботі 2016 року [25], тут софороліпіди *S. bombicola* CBS 6009 в концентрації 1,5 г/л руйнують біоплівку *E. coli* на 50%, а за концентрації 0,4 г/л *S. aureus* на 99%.

Софороліпіди *S. bombicola* [22] лише лактонної форми в концентрації 0,2 г/л на 90% руйнують біоплівку утворену мікроорганізмами роду *Streptococcus*.

Узагальнюючі дані наведені в таблиці 1.6.

Таблиця 1.6

Деструкція біоплівки під дією софороліпідів мікробного походження

Штам-продуцент	Культивування		Склад софороліпідів	Тест-культура	Концентрація софороліпідів, г/л	Ступінь руйнування, %	Література
	Склад поживного середовища	Особливості культивування					
<i>Starmerella bombicola</i> lactone esterase overexpresion strain (oe sble)	Глюкоза – 100 г; Висушені кукурудзяні висівки – 5 г; K ₂ HPO ₄ – 1 г; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4 г; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5 г; Ріпакова олія – 12 г.	Ферментер 150 л (заповнений на 60 л), після 20 год ферментації додається 0,8 г/год ріпакової олії. За допомогою підживлюючого розчину глюкози, її концентрації завжди на рівні 30-50 г/л; 260 год 25 °С; рН 3-5.	Софороліпіди лактонної форми	<i>Streptococcus mutans</i> DSM-20523	0,2	99,9	22
				<i>Streptococcus oralis</i> DSM-20627	0,2	90	
				<i>Streptococcus sanguinis</i> NCTC-7863	0,2	92	
				<i>Actinomyces naeslundii</i> DSM-43013	0,2	94	
				<i>Neisseria mucosa</i> DSM-4631	0,2	90	
<i>Starmella bombicola</i> CBS 6009	Глюкоза – 100 г; пептон – 5 г; дріжджовий екстракт – 5 г; Олеїнова кислота – 20г.	Колби; 144 год.	Кислі та лактонні форми (співвідношення не наведено)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,5	50	25
				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,38	100	
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Глюкоза – 100 г; Дріжджовий екстракт – 5 г; Сечовина – 5 г.	Колби	Кислі та лактонні форми (співвідношення не наведено)	<i>Candida albicans</i> IHEM 2894	8	70	26
				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8	77	

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

2.1. Передумови виробництва ЛЗ.

У даному курсовому проекті пропонується використання софороліпідів *Starmerella bombicola* NBRC 10243, в якості компонента косметичного гелю для вмивання обличчя «Lactoferrin Lab».

Відомо, що софороліпіди володіють найрізноманітнішими функціями і використовуються як емульгатори, піноутворювачі, солюбілізатори, зволожуючі та миючі засоби та мають біологічну активність, яка використовується в якості активних інгредієнтів в косметиці. Багатофункціональні біологічні поверхнево-активні речовини, такі як софороліпіди мають кілька косметичних застосувань [34] та доведено, що софороліпіди мають хорошу сумісність зі шкірою і відмінні зволожуючі властивості [34].

На додаток до своїх емульгуючих функцій, софороліпіди є потужними бактерицидними агентами і застосовуються при лікуванні вугрів, лупи та сторонніх запахів тіла [34]. Показано, що метаболізм фібробластів шкіри та неосинтез колагену стимулюються софороліпідами.

Софороліпіди комерційно виробляються, як зволожувачі компоненти, і присутні в косметиці «Sofina» та «Soliance», які виробляються для нанесення на шкіру та містять як активний інгредієнт „Sopholiance S“. Софороліпіди також присутні в рум'янах, губних помадах у формі олівця, кремах для губ і тінях для повік [34].

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Зварич А.О.						
Перевір.		Пирог Т.П.					27	9
Реценз.		Пасічник Ю.В.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Але, незважаючи на успішне застосування мікробних софороліпідів в світовій косметології досі використовуються софороліпіди хімічного походження, як наприклад в лінійці догляду за шкірою обличчя «Lactoferrin Lab». Проте, близько 50% хімічних поверхнево-активних речовин на ринку мають нафтохімічне походження і тому отримуються з нестійких ресурсів. Хоча ці хімічні поверхнево-активні речовини надзвичайно ефективні у рецептурах, припускають, що вони можуть бути шкідливими для шкіри. Їх тривале використання та висока концентрація можуть спричинити солюбілізацію епідерми та внутрішньоклітинних ліпідів, таким чином, впливаючи на структурну цілісність та бар'єрні функції шкіри. З цих причин виникає поштовх для заміни хімічних поверхнево-активних речовин іншими сполуками [35].

Тому перспективною є заміна синтетичних софороліпідів на софороліпіди мікробного походження в даній косметиці.

2.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.

Для того, щоб краще розуміти сферу в якій плануємо розповсюдити застосування мікробних поверхнево-активних речовин, таких як софороліпіди, необхідно ознайомитись з основними трендами на даному, косметичному ринку в Україні.

Компанія Pro-Consulting підготувала дослідження ринку косметики в Україні за 2015 – 2020 [36]. В ході дослідження було проведено аналіз тенденцій розвитку ринку в динаміці: визначено фактори впливу, проблеми розвитку. У досліджуваний період на ринку косметики в Україні спостерігалися наступні тенденції.

1. Зростання сегмента онлайн-продажів.

2. Розвиток ринку б'юті-послуг. Зокрема, розвивається саме косметологія, тож догляд за шкірою обличчя, зокрема професійний та правильний зараз в тренді.

3. *Зростання частки корейської косметики на ринку.* У світі корейська косметика має імідж високоякісної, що виготовляється з натуральних компонентів. Слід зазначити, що японська косметика в цьому питанні не відстає, а обрана нами фірма «Lactoferrin Lab» саме японська.

4. *Екотренд в сфері краси.* Мода на здоров'я присутній в тому числі і на ринку косметики. Такі виробники «здорових» БАД, як Гербалайф, Дуолайф і інші, крім харчових добавок, виробляють також здорову косметику, попит на яку зростає. Софороліпіди, як одні з компонентів доглядової косметики, які мають одну з переваг - екологічність, повністю підходять під цей пункт.

5. *Розширення цільової аудиторії ринку.*

6. *Зміни в складі косметичних засобів.* Розвиток хімічної промисловості призводить до зростання вимогливості споживача до складу придбаної продукції, так як споживач не бажає, щоб косметичні засоби якимось чином могли зашкодити його / її організму. Наприклад, такі світові бренди, як L'Oreal, Chanel і Revlon поступово відмовляються від використання тальку в своїй продукції. Одже заміна синтетичних поверхнево-активних речовин на такі ж мікробного походження викличе підтримку споживача.

7. *Зменшення обсягів споживання декоративної косметики в зв'язку з карантинном (актуально з весни 2020 року).* При відсутності необхідності / можливості залишати житло, а також при необхідності носити маску, яка закриває значну частину обличчя, багато споживачів, переважно жінки, скоротили використання декоративної косметики, що не може не відбиватися на продажах. Крім цього, дистриб'ютори косметики відзначають, що в зв'язку з карантинном вони не спостерігали зменшень в продажах косметики в цілому, так як зменшення продажів декоративної косметики **компенсувалося зростанням продажів косметики по догляду за шкірою** (креми, маски, лосьйони і т.д.).

2.3. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

За даними української держстатистики [37] в Україні віком від 16 до 59 років (саме в цьому віці жінки цікавляться доглядовою косметикою для шкіри обличчя) налічується 13 млн жінок. Припускаємо, що 10% з них користуються косметикою класу люкс (ціна вище середнього), а це:

$$13 \times 0,1 = 1,3 \text{ млн жінок}$$

Так, як на ринку представлено дуже багато варіацій люксової косметики, даним брендом «Lactoferrin Lab» (і зокрема вибраним продуктом) буде користуватися не більше 5% жінок:

$$1\,300\,000 \times 5 / 100 = 65\,000 \text{ жінок}$$

Половина з даних жінок куплять даний гель повторно (однієї баночки вистачає максимум на пів року):

$$65\,000 \times 1,5 = 97\,500 \text{ баночок}$$

Об'єм кожної баночки 50 мл, отже в рік необхідно виготовляти:

$$97\,500 \times 0,05 = \mathbf{4875 \text{ л гелю.}}$$

2.1.3. Розрахунок річної потужності виробництва софороліпідів, об'єму ферментера для біосинтезу та кількості виробничих циклів.

Експертами встановлено, що ефективна та оптимальна концентрація софороліпідів для використання в доглядовій косметиці становить 2 % [38]. Таким чином нам необхідно 4 875 л готового гелю для вмивання з концентрацією софороліпідів 20 г/л.

Необхідно розрахувати потрібну для приготування даного об'єму кількість софороліпідів:

$$20 \text{ г софололіпідів} - 1 \text{ л гелю}$$

$$X \text{ г ПАР} - 4\,875 \text{ л розчину,}$$

де X – кількість софороліпідів для утворення 4 875 л розчину, г.

$$X = 4\,875 \times 20/1 = 97\,500 \text{ г} = 97,5 \text{ кг}$$

Концентрація софороліпідів в культуральній рідині при культивуванні *S. bombicola* NBRC 10243 на олії строфи становить 122 г/л [6]. Таким чином розраховуємо кількість культуральної рідини, що потрібна для одержання необхідної кількості софороліпідів:

$$0,122 \text{ кг софороліпідів} - 1 \text{ л культуральної рідини}$$

$$97,5 \text{ кг софороліпідів} - Y \text{ л культуральної рідини,}$$

де Y – кількість культуральної рідини для одержання необхідної кількості софороліпідів, л.

$$Y = 97,5 / 0,122 = 800 \text{ л}$$

Приймаємо продуктивність підприємства рівну 800 л

Отже, приготування гелю для вмивання «Lactoferrin Lab» на потреби українських жінок необхідно **800 л культуральної рідини в рік.**

Отримавши кількість культуральної рідини, яка потрібна на рік, розраховуємо скільки культуральної рідини необхідно отримати за цикл ферментації.

Спочатку необхідно прийняти кількість робочих трудоднів ($T_{рд} = 60$). Кількість трудоднів встановлена опираючись на той факт, що інші 270 днів виробництво буде працювати для синтезу інших поверхнево активних речовин, як компонентів засобів по догляду за обличчям.

Враховуючи ці дані кількість продукту на одну добу ($V_{гпд}$) становить:

$$V_{гпд} = V_{гп} / T_{рд} = 800 / 60 = 13,33 \text{ л/добу.}$$

Визначаємо кількість продукту за цикл:

$$V_{\text{цк}} = V_{\text{нд}} \times T_{\text{цф}} / 24 = 13,33 \times 175,5 / 24 = 97,48 \text{ л}$$

де $T_{\text{цф}}$ – це цикл роботи ферментера, що складається з часу ферментації при виробничому біосинтезі - 168 год та з часу підготовчих операцій - 7,5 год.

Підготовчі операції - це миття та огляд обладнання - 1,5 год, перевірка на герметичність - 0,5 год, підігрів апарату - 0,5 год, стерилізація обладнання - 1 год, охолодження після стерилізації - 1 год, завантаження середовища в реактор - 1,5 год, засів посівним матеріалом - 0,5 год, вивантаження культуральної рідини - 1 год.

Кількість ферментацій на рік:

$$N_{\text{цк}} = V_{\text{нт}} / V_{\text{цк}} = 800 / 97,48 = 9.$$

Далі необхідно розрахувати кількість культуральної рідини за один цикл ($V_{\text{кр}}$), $\text{м}^3/\text{цикл}$:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times V_{\text{цк}} \times P_{\text{гп}} / P_{\text{ст}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,2 \times 97,48 \times 100 / 87,8 (1 - 0,15) = 156,8,$$

де K_1 – це коефіцієнт запасу, який враховує можливість нестерильних операцій (приймаємо, що $K_1 = 1,2$); вміст продукту у культуральній рідині $P_{\text{ст}} = 87,8$ об.%. При чому готовий продукт, це 100% софороліпід ($P_{\text{гп}} = 100$ об.%). $E_{\text{св}}$ - втрати при виділенні (15 %).

Такий об'єм культуральної рідини (156,8 л) можливо отримати у ферментері з таким геометричним об'ємом:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{кр}} / K_3 = 156,8 / 0,6 = 261,33 \text{ л},$$

де K_3 – це коефіцієнт заповнення ферментера, $K_3 = 0,6$, дане значення обирається в межах від 0,5 до 0,65.

У ГОСТ 20680–2002 можемо знайти найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{нф}} = 300$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{зф} = V_{ф}/V_{нф} = 156,8/300 = 0,52.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує межі норми.

Отже, для отримання 156,8 л культуральної рідини обираємо ферментер об'ємом 300 л.

Розрахунок кількості стадій одержання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері

За виробничий цикл необхідно одержати $V_{кр} = 156,8$ л культуральної рідини.

Кількість посівного матеріалу та поживного середовища перед виробничим біосинтезом враховуючи втрати при крапливності через колектор відпрацьованого повітря (10%) становить:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{156,8}{1 - 0,1} \approx 174,2 \text{ л}$$

де $E_{ф}$ – це втрати культуральної рідини впродовж біосинтезу.

Виробничий біосинтез необхідно здійснювати у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 174,2 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,52$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1} = 174,2/0,52 = 335$ л. Прийmemo найближчий за об'ємом стандартизований ферментер $V_{сф} = 300$ та уточнимо прийнятий нами раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{174,2}{300} = 0,58$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує допустимі межі.

Кількість посівного матеріалу - 10% від об'єму всього поживного середовища. Отже, кількість поживного середовища для ферментера становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{174,2}{1 + 0,1} = 158,4 \text{ л}$$

де $X_{\text{ф}}$ – це доза посівного матеріалу у ферментері.

Кількість посівного матеріалу у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 174,2 - 158,4 = 15,8 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу необхідного для вирощування культури в посівному апараті на першому етапі

Для того, щоб отримати 15,8 л посівного матеріалу кількість посівного матеріалу та поживного середовища перед культивуванням в інокуляторі, враховуючи втрати в результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%), становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{15,8}{1 - 0,1} = 17,5 \text{ л}$$

Геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 17,5/0,6 = 29,16 \text{ л}$. Приймемо найближчий за об'ємом стандартизований ферментер $V_{\text{сф}} = 30 \text{ л}$ та уточнимо прийнятий нами раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{17,5}{30} = 0,58$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі при цьому становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{17,5}{1 + 0,1} = 15,9 \text{ л}$$

Отже, посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 17,5 - 15,9 = 1,6 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу необхідного для вирощування культури в посівному апараті на другому етапі

Для отримання 1,6 л посівного матеріалу кількість посівного матеріалу та поживного середовища перед культивуванням в інокуляторі враховуючи

втрати при крапливності через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{1,6}{1 - 0,1} = 1,78 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 1,78/0,6 = 2,96$. Прийmemo найближчий за об'ємом стандартизований ферментер $V_{\text{сф}} = 3$ л та уточнимо прийнятий нами раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{1,78}{3} = 0,59$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує дозволених межі.

Кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{1,78}{1 + 0,1} = 1,62$$

Отже, кількість посівного матеріалу для роботи інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 1,78 - 1,62 = 0,16 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу необхідного для вирощування культури в колбах на качалці

Для отримання 0,16 л посівного матеріалу використовують колби на качалках з об'ємом 750 мл та заповнюють їх на 100 мл. Кількість колб буде становити:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{160}{100} = 1,6 = 2 \text{ шт.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу в нашому випадку необхідно 3 качалочні колби.

Підсумовуючи, можна сказати, що процес одержання посівного матеріалу задля забезпечення виробничого біосинтезу софороліпідів у ферментері об'ємом 300 л з коефіцієнтом заповнення 0,58 буде проходити у три етапи.

РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ

3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування

Як основу для обґрунтування щодо вибору біологічного агента обираємо продуцент, що найчастіше використовується для продукування софороліпідів, як активних компонентів косметичних засобів - *Starmerella bombicola* (раніше штам називався *Candida bombicola*, тому може зустрічатись і дана назва) [38], що при культивуванні здатна продукувати 80-150 г/л поверхнево-активних речовин гліколіпідної природи – софороліпідів [38].

Нами було обрано 3 штами для порівняння: *S. bombicola* NRRLY – 17069 [4], *C. bombicola* ATCC 22214 [12] та *S. bombicola* NBRC 10243 [6]. Культивування даних штамів наукоцями було проведено в біологічних реакторах, що полегшує процес масштабування даного синтезу на промисловий рівень.

Найважливішим показником при порівнянні даних продуцентів була кількість утвореного продукту. Оскільки час культивування у всіх 3 штамів не надто розбігається і складає 192-168 год, то показник кількості ПАР є важливим. Так *S. bombicola* NRRLY – 17069 та *C. bombicola* ATCC 22214 синтезують 52 та 54 г/л відповідно, в той час як *S. bombicola* NBRC 10243 продукує 122 г/л цільового продукту [4,6,12]. Технологічною особливістю вирощування *C. bombicola* ATCC 22214 є те, що в ході процесу рН доводять до 3,5 за допомогою 1,0 М НСІ та 1,0 М NaOH. Дані стосовно культивування цих штамів наведені в таблиці 3.1.

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Зварич А.О.						36	33
Перевір.	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ		
Реценз.	Пасічник Ю.В.							
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Таблиця 3.1

Вибір біологічного агента

Біологічні агенти	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація софороліпідів, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості	Використана література
<i>Starmerella bombicola</i> NRRL Y-17069	Гліцерол технічний – 100 г; дріжджовий екстракт – 10 г; сечовина – 1 г; олеїнова кислота – 100 г	52,34	192	Ферментер 5 л, заповнений на 2 л 25 °C 200 об/хв. Відсутня регуляція pH	Bajaj, V. K., Annapure, U. S. Castor Oil as Secondary Carbon Source for Production of Sophorolipids Using <i>Starmerella bombicola</i> NRRL Y-17069. <i>Journal of Oleo Science</i> . 2015; 64(3): 315–323
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Глюкоза – 100 г; Дріжджовий екстракт – 5 г; KH ₂ PO ₄ – 1 г; CaCl ₂ · 2 H ₂ O – 0,1 г; NaCl – 0,1 г; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г; пептон – 0,7 г; кососова олія – 100 г	54	192	Ферментер 30 л (заповнення на 15 л) 30 °C 550 об/хв pH 3,5, автоматична регуляція pH за допомогою NaOH та HCl	Morya, V. K., Park, J., Kim, T. J., Jeon, S., Kim, E.-K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. <i>Bioresource Technology</i> . 2013; 143: 282–288.

Закінчення таблиці 3.1.

<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Олія ятрофи – 100 г; Глюкоза- 50 г; Дріжджовий екстракт – 3г; Сечовина – 1г; NaCl – 0,1 г; KH ₂ PO ₄ – 1 г ; MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0,5 г	122,6	168	5 л ферментер 25 °C 500 об/хв. pH 7	. Imura, T., Kawamura, D., Morita, T., Sato, S., Fukuoka, T., Yamagata, Y., Kitamoto, D. Production of Sophorolipids from Non- edible Jatropha Oil by <i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243 and Evaluation of their Interfacial Properties. <i>Journal of Oleo Science</i> . 2013; 62(10): 857–864.
--	---	--------------	------------	--	--

Перевірка складу поживного середовища для вирощування *S. bombicola* NBRC 10243 – продуцента поверхнево-активних речовин - софороліпідів. Тривалість культивування 168 год, концентрація софороліпиду в культуральній рідині становить 122 г/л, а концентрація біомаси – 30 г/л.

Розрахунок витрат джерела вуглецевого живлення на потреби клітини. Потреби для синтезу софороліпиду. Як джерело вуглецю для одержання софороліпиду використовується олія ятрофи. Олія строфи як і будь яка інша складається з суміші олій. Загальна формула будь якої олії чи жиру $C_nH_{2n}O_2$. В перерахунку на молекулярну масу вміст вуглецю у олії становить 76%. Необхідно розрахувати, скільки вуглецю (розраховуємо за елементом С) міститься в 122 г софороліпиду. Молекулярна маса софороліпиду, якщо розглядати загальну формулу) становить 427. Отже, у 427 г софороліпиду міститься 192 г вуглецю [39], а в 122 г софороліпиду $(192 \times 122) / 427 = 55$ г вуглецю. Наступним етапом розрахунку буде прорахувати, у скількох грамах вуглеводів міститься 55 г вуглецю, враховуючи, що вміст вуглецю у олії становить 76%. Отже, у 100 г олії міститься 76 г вуглецю, а 55 г вуглецю міститься у $(55 \times 100) / 76 = 72$ г олії. Нам відома інформація, що при вирощуванні мікроорганізмів 40% субстрату окислюється до CO_2 задля одержання енергії, що необхідна для конструктивного метаболізму. Отже, вміст олії у середовищі становитиме $(72 \times 0,4) + 72 = 100$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси. Як джерело вуглецю для одержання біомаси може використовуватися внесена глюкоза. Молекулярна маса глюкози - 180 г, а вуглецю при цьому 72г. Необхідно розрахувати, скільки вуглецю (вираховуємо за елементом С) міститься в 100 г глюкози, $(72 \times 100)/180 = 40$. Відомо, що у біомасі міститься 50 % вуглецю, отож вміст вуглецю у 30 г біомаси становить $30 \times 0,5 = 15$ г. Така кількість вуглецю міститься у $(15 \times 100) / 40 = 37,5$ г глюкози. Враховуючи той факт, що кожна клітина витрачає 40% субстрату на «холосте окислення», то для одержання 30 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(37,5 \times 0,4) + 37,5 = 52$ г/л глюкози (5 %). Отже, загальний вміст олії та глюкози що вказаний в науковій літературі при прописі середовища відповідає дійсності, за допомогою такої кількості субстрату

справді можна отримати 122г/л софороліпиду та 30 г/л біомаси враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення».

Проте, оскільки склад поживних середовищ у трьох продуцентів суттєво відрізняється, то використовувати лише показник концентрації ПАР вважаємо некоректним та недостатнім для вибору найкращого біологічного агенту.

Отже, наступним завданням перед нами постало оцінити вартість поживних середовищ для культивування всіх продуцентів

Так користуючись цінами, які доступні на сайтах українських постачальників станом на весну 2021 року нам вдалось розрахувати, що найдешевше середовище культивування у *S. bombicola* NBRC 10243 – 5 грн, у той час як для *S. bombicola* NRRLY – 17069 та *C. bombicola* ATCC 22214 становить 18 та 25 грн відповідно (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації *
<i>Starmerella bombicola</i> NRRLY - 17069	Гліцерол технічний – 100 г;	32	3,2	[1]
	дріжджовий екстракт – 10г;	1100	11	[2]
	сечовина – 1 г;	18	0,018	[3]
	олеїнова кислота – 100 г	31	3,6	[4]
	Вартість 1 л середовища – 17,818 грн			
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Глюкоза – 100г;	32	3,2	[5]
	Дріжджовий екстракт – 5г;	1100	5,5	[2]

Закінчення таблиці 3.2.

	KH_2PO_4 – 1г;	120	0,12	[6]
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г	12	0,006	[7]
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,1 г;	15	0,0015	[8]
	NaCl – 0,1 г;	3,3	0,00033	[9]
	пептон – 0,7г;	1100	0,77	[10]
	кососова олія – 100г;	150	15	[11]
	Вартість 1 л середовища – 24,59 грн			
<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Олія ятрофи – 100 г;	0,4	0,04	[12]
	Глюкоза- 50 г;	32	1,6	[5]
	Дріжджовий екстракт – 3г;	1100	3,3	[2]
	Сечовина – 1г;	18	0,018	[3]
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г;	12	0,006	[7]
	NaCl – 0,1 г;	3,3	0,00033	[9]
	KH_2PO_4 – 1 г	120	0,12	[6]
	Вартість 1 л середовища –5,09 грн			

Примітка. * - Ціни наведені за показниками станом на весну 2021 р.

1. <https://prom.ua/p1154391822-glitserin.html?&primelead=MS41NQ>
2. <https://prom.ua/p1201453933-drizhdzhovij-ekstrakt-spetsialnij.html>
3. <https://prom.ua/p1216792989-karbamid-sechovina.html>
4. <https://prom.ua/p1109849244-oleinovaya-kislota.html?&primelead=Ny4yMQ>
5. <https://prom.ua/p755976288-glyukoza-pischevaya.html?>
6. <https://prom.ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>

7. <https://prom.ua/p40341252-magnij-sernokislyj-mnogovodnyj.html?&primelead=MS4xNw>
8. <https://prom.ua/p1296604649-kaltsij-hloristyj.html?&primelead=MS4wOA>
9. <https://prom.ua/p1100353722-sol-pischevaya-krupnogo.html?>
10. <https://prom.ua/p1201447859-pepton-nejtralizovaniy-100.html>
11. <https://prom.ua/p1287651361-vitanella-olej-kokosowy.html?>
12. <https://m.russian.alibaba.com/goods/jatropha-oil-products.html>

Для коректного порівняння даних продуцентів ми розраховали також умовну вартість 1 г софороліпідів та концентрацію софороліпідів, синтезованих за 1 год. Як показує нам табл. 2.3, штам *S. bombicola* NRRLY – 17069 синтезує 0,27 г/л софороліпідів в год, з умовною вартістю 1 г цільового продукту – 0,34 грн, а *C. bombicola* ATCC 22214 – 0,28 г/л з вартістю 0,45 грн. В цей час *S. bombicola* NBRC 10243 синтезує вищу концентрацію поверхнево-активних речовин – 0,73 г/л софороліпідів за год, при цьому, зазначимо, що умовна вартість 1 г продукту становить лише 0,04 грн.

Таблиця 3.3

Умовна вартість софороліпідів

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн./г	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР за годину, г/год
<i>Starmerella bombicola</i> NRRLY – 17069	17,818	52,34	0,34	192	0,27
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	24,59	54	0,45	192	0,28
<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	5,09	122,6	0,04	168	0,73

Зважаючи на високі показники синтезу та дешевизну поживного середовища *S. bombicola* NBRC 10243 є найкращим продуцентом софороліпідів, для використання в косметичних засобах, з проаналізованих штамів.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Обґрунтування способу культивування

S. bombicola NBRC 10243 синтезує позаклітинні софороліпіди, тож коректно при виборі способу культивування даного продуцента віддати перевагу глибинному способу, тому що, за поверхневого культивування максимально важко виділити позаклітинні метаболіти. *S. bombicola* NBRC 10243 – аеробний штам, тому потребує подачі аераційного повітря, що можливо забезпечити в ферментаторі за допомогою барботеру.

Хоча відомо про суттєві переваги безперервного культивування над періодичним, біосинтез софороліпідів необхідно здійснювати періодичним процесом, так як максимальний синтез вторинних метаболітів відбувається саме у стаціонарній фазі росту продуцента. Тож, «підтримання» штаму-продуцента в експоненційній фазі росту не є обґрунтованим, так як при цьому спостерігатиметься стрімке зниження концентрації софороліпідів у культуральній рідині.

Оптимальна температура для культивування *S. bombicola* NBRC 10243 - 25°C, а оптимальне значення рН 6,5-7, тож існує велика ймовірність контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Отже, в обов'язковому порядку необхідно проводити стерилізацію поживного середовища, обладнання і комунікацій, а також аераційного повітря. Ще одним способом запобігання контамінації в ферментері є створення надлишкового тиску.

Таким чином, для культивування даного біологічного агента необхідно забезпечити періодичне глибинне культивування в стерильних умовах з подачею стерильного аераційного повітря.

Обґрунтування типу ферментера

Для культивування *S. bombicola* NBRC 10243 потрібно аерувати середовище, оскільки бактерії - облигатні аероби. Отже, використовуємо ферментер, оснащений барботером.

Слідкувати за рівнем рН середовища необхідно за допомогою відповідного датчика, що відображає значення рН.

Для того, щоб розчинений кисень поширився по всьому об'ємі ферментера, необхідним є встановлення мішалки. Так як в процесі біосинтезу не утворюється міцелій, не злипається біомаси, не відбувається накопичення метаболітів, що підвищують в'язкість середовища, і даний процес не вимагає інтенсивного масообміну, то пропонується використовувати найпростішу за конструкцією мішалку, а саме лопатеву (з шістьма лопатями). До того ж ферментер оснащений чотирма відбивними перегородками для того щоб запобігати утворенню воронки при перемішуванні. Схема ферментера зображена на рис. 3.1.

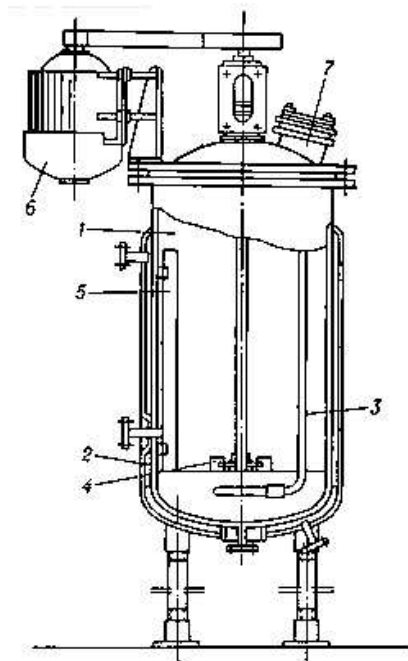


Рис.3.1 Ферментер: 1 — корпус; 2 — парова сорочка; 3 — барботер; 4 — мішалка; 5 — відбійник; 6 — електропривід; 7 — загрузочний люк.

Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

При виробничому біосинтезі софороліпідів *S. bombicola* NBRC 10243 використовується середовище наступного складу (г/л):

- Олія ятрофи – 100 г;
- Глюкоза- 50 г;
- Дріжджовий екстракт – 3г;
- Сечовина – 1г;
- NaCl – 0,1 г;
- KH_2PO_4 – 1 г ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г;

Важливо зазначити, що для вирощування посівного матеріалу склад поживного середовища відрізняється та виглядає так (г/л) [6]:

- Глюкоза – 10 г;
- Пептон – 3 г;
- Дріжджовий автолізат – 3 г;
- Екстракт мальтози – 3 г.

Для забезпечення ефективного процесу біосинтезу в виробничому ферментері 300 л основні та фосфорні солі стерилізуються разом, тому для уникнення утворення нерозчинних фосфатів кальцію та магнію рН розчину з солями необхідно доводити до значення 4-4,5. Це можливо за допомогою 6%-вого розчину соляної кислоти.

Але, оскільки для вирощування культури значення рН повинно бути на нейтральному рівні, то перед внесенням посівного матеріалу кисле середовище необхідно стабілізуват, в поживне середовище додають стерильний 6%-вий розчин NaOH.

Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Поживне середовище для вирощування *S. bombycola* NBRC 10243, умовно можна поділити, залежно від режиму стерилізації компонентів, на такі композиції:

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

Глюкоза, дріжджовий автолізат, мальтозний екстракт, пептон (композиція А) є термолабільними компонентами і потребують м'якого режиму стерилізації. Для стерилізації композиції поживного середовища необхідно встановити стерилізаційний горизонтальний автоклав.

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 3 та 30 л

Об'єми поживних середовищ надто великі для стерилізації в автоклаві, тому їх необхідно стерилізувати безпосередньо в посівному апараті. Тож, перед кожним посівним апаратом необхідно розмістити збірник відповідного об'єму для того, щоб приготувати композиції.

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

Стерилізація композиції А відбувається в реакторі, де попередньо готується розчин.

Виробниче культивування в ферментаторі на 300 л

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: олія ятрофи (режим стерилізації: 120 °С, 120 хв).

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

Композиція В: Сечовина, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, NaCl , KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40хв, рН 4,0 – 4,5).

Підсумуємо, що технологічна схема, враховуючи стадії підготовки поживного середовища, включає в себе такі додаткові стадії:

- 1) приготування 6%-вого розчину HCl, для того, щоб підкислювати середовище при стерилізації солей в виробничому ферментері;
- 2) приготування та обов'язкова стерилізація 6% розчину NaOH, для того, щоб стабілізувати рівень pH середовища перед культивуванням в виробничому ферментері;

Окрім основних збірників для розчинення композицій, що встановлені перед ферментерами, варто передбачити такі ємності:

- В цеху виробничого біосинтезу:
 - 30 л збірник для стерилізації олії ятрофи;
 - 50 л збірник для приготування та стерилізації термолабільних компонентів;

3.3. Обґрунтування стадій виділення та очищення субстанції для виробництва готового продукту

Реалізація біотехнологічного процесу відбувається за принциповою схемою, яку зображено на рис. 3.2 [40]. Даною узагальненою схемою і будемо користуватись описуючи стадії виділення та очищення цільового продукту.

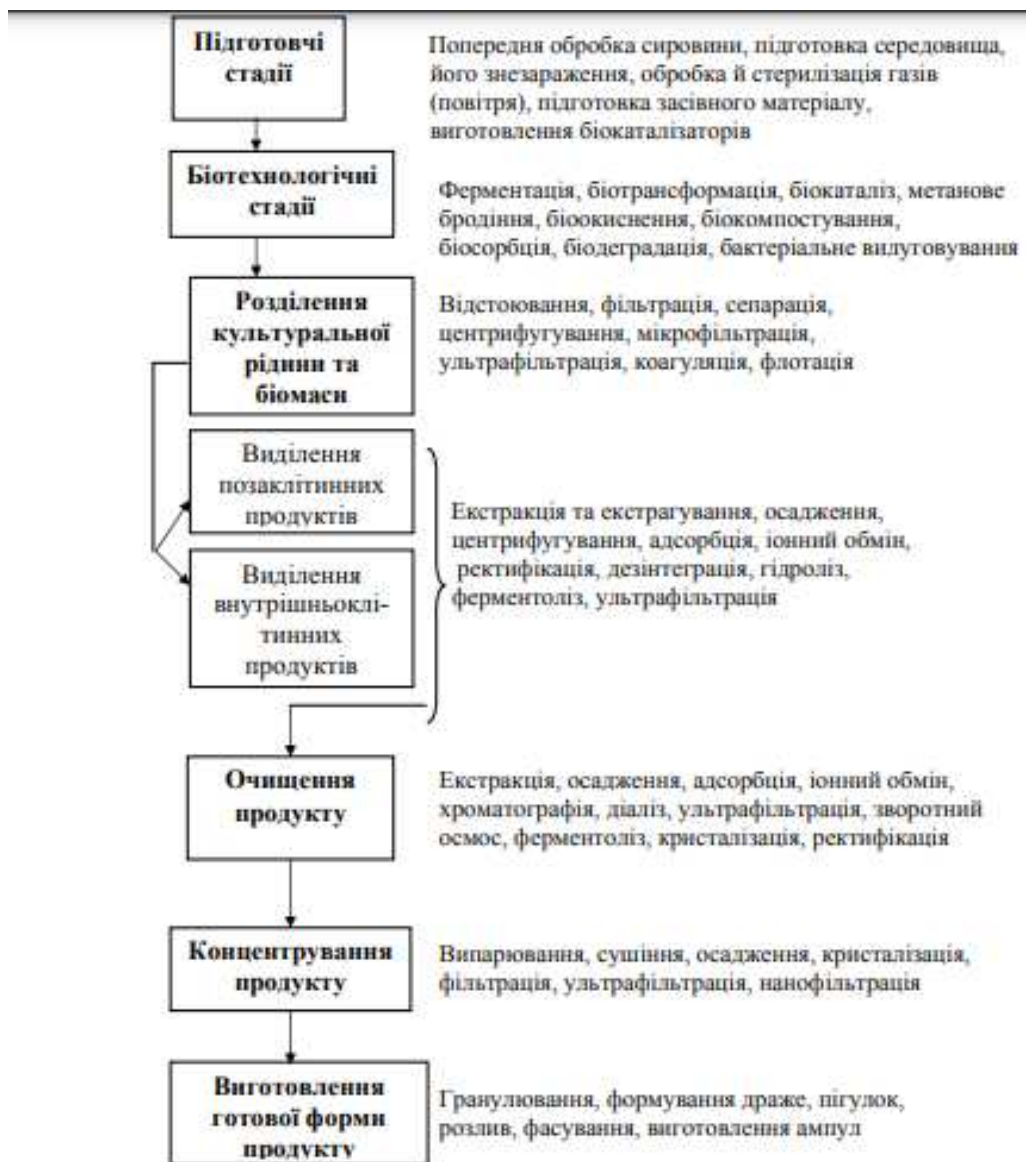


Рис.3.2. Узагальнена схема стадій біотехнологічного виробництва [40]

Виділення та очищення софороліпідів наведено на основі статті [41]. Хоча в даній статті не наведено промислове очищення софороліпідів, а лише лабораторне, в даній роботі ми його масштабуємо для одержання 97,5 кг цільового продукту для використання в косметичних засобах. За 1 цикл необхідно очищати 174 л культуральної рідини, з яких необхідно отримати 12,2 кг софороліпідів (розрахунки наведені в техніко-економічному обґрунтуванні).

3.3.1. Розділення культуральної рідини та біомаси

Методи відділення біомаси від культуральної рідини бувають різноманітні: центрифугування чи сепарування; осадження за допомогою

флокулянтів чи шляхом змін розчинності речовини; фільтрація; дистиляція; сублімація; сорбція; екстракція; кристалізація; ультрафільтрація на мембранних фільтрах та застосування вакуум-фільтрів [40].

Використання деяких методів неможливе без попередньої обробки культуральної рідини (фільтрація, застосування вакуум-фільтрів, ультрафільтрація). Це пов'язано з малим розміром клітин, а також з високою в'язкістю середовища, закупорюванням пор у фільтрах та великою кількістю домішок [40,42].

Флотація – є неефективним методом відділення біомаси культуральної рідини (КР) в нашому випадку через невисоку ступінь очистки, а також економічну недоцільність процесу, так як процес потребує попередньої обробки КР, а це в свою чергу є дорогівартісним та громіздким процесом для промислового виробництва і потребує додаткових вкладів для реактивів та обладнання [42,43].

Вигідніше застосовувати сепаратори, що застосовують при розділенні суспензій зі високою та середньою концентрацією твердої фази, а також для в'язких суспензій та емульсій. Цей спосіб є економічно доцільним, працює у безперервному режимі, та є можливість ручного вивантаження осаду з максимальним відділенням клітини.

Культуральну рідину можливо сепарувати (6500 об\хв, 30 хв) допомогою сепаратора типу ОВРП-0,15М (рис.3.3) з можливістю ручного вивантаження осаду, продуктивністю 100 л / год, з можливістю підігрівати та охолоджувати культуральну рідину [44].

На сепарування буде надходити **175 л** культуральної рідини з біореактора кожен цикл. 30 г/л в культуральній рідині становить біомаса, яка містить 70-75% вологості, тобто в культуральній рідині міститься 100 г/л вологої біомаси, яка відділиться при сепаруванні. На 175 л культуральної рідини припадає 17,5 кг вологої біомаси, що становить 10%. А також ще 10 % - це втрати на даному етапі.

$$175 - 20\% = 140 \text{ (л)}$$

Тож після сепарування залишається **140 л** супернатанту який надходить на наступний етап виділення.



Рис.3.3. Сепаратор ОВРП-0,15М [44].

3.3.2. Виділення цільового продукту

Одним із найважливіших факторів, що визначає рентабельність будь-якого біотехнологічного виробництва, є метод виділення та очищення цільового продукту. Для багатьох продуктів мікробного синтезу витрати на очищення становлять приблизно 60 % загальних витрат на виробництво. Для виділення поверхнево-активних речовин у промисловості використовується ряд традиційних методів, зокрема, кислотне осадження, екстракція органічними розчинниками, кристалізація, осадження сульфатом амонію, центрифугування тощо [45].

Метод виділення звісно залежить від фізико-хімічних властивостей, дана залежність наведена в таблиці 3.4.

**Вибір методу виділення поверхнево\активних речовин залежно від
їхніх фізико-хімічних властивостей [46]**

Метод виділення	Властивості ПАР, що визначають вибір методу	Необхідне апаратурне забезпечення	Переваги методу
Кислотне осадження	Здатність ПАР переходити у малорозчинну форму за низьких значень рН	Збірник	Низька вартість, висока ефективність виділення
Осадження сульфатом амонію	Здатність ПАР білкової природи за певних значень іонної сили розчину (ізоелектрична точка) переходити у малорозчинну форму	Збірник	Ефективність у разі виділення деяких груп полімерних ПАР
Екстракція органічними розчинниками	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їхній молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Ефективний метод для виділення та часткового очищення ПАР, можливість регенерації розчинника
Екстракція метилтрет бутиловим ефіром	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їхній молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Використання низькотоксичного розчинника, можливість регенерації екстрагента, низька вартість
Флотація	Здатність ПАР завдяки поверхневоактивним властивостям формувати піну і переходити в неї	Спеціально сконструйовані реактори	Можливість організації безперервного процесу виділення ПАР, високий ступінь очищення ПАР
Ультрафільтрація	Здатність ПАР формувати міцели, що затримуються полімерними мембранами	Ультрафільтраційний модуль, що містить полімерні пористі мембрани	Можливість проведення швидкої регенерації мембран, високий рівень чистоти одержаних препаратів
Адсорбція на полістирольних матрицях	Здатність до адсорбції ПАР на полімерних носіях з наступною десорбцією органічними розчинниками	Колонки, заповнені полістирольним носієм	Можливість проведення швидкої регенерації носія, високий рівень чистоти одержаних препаратів

Закінчення таблиці 3.4.

Адсорбція на активованому вугіллі	Здатність ПАР адсорбуватись на активованому вугіллі та десорбуватись органічними розчинниками	Колонки, заповнені сорбційним матеріалом, або безпосереднє внесення вугілля в культуральну рідину	Можливість одержання високоочищених препаратів, швидка регенерація сорбенту, низька вартість
Іонообмінна хроматографія	Полярність молекули ПАР, що зумовлює здатність до обміну зарядженої його частини на рухомі іони катіонів та аніонів	Колонки, заповнені іонообмінною смолою	Можливість одержання високоочищених препаратів, багаторазове використання носія, швидкий процес регенерації

Для виділення софороліпідів обирають **екстракцію** розчинником етилацетатом та ізопропанолом в співвідношенні 8:2 [41]. В статті [41] зазначено, що використовується рівне співвідношення розчинників відносно супернатанту (1:1). Тобто доцільно встановити збірник на 300 л в якому приготуємо суміш екстрагентів (140 л) - етилацетату (112 л) та ізопропанолу (28 л).

Екстракція – це процес вилучення одного чи декількох компонентів з твердих тіл чи розчинів за допомогою екстрагентів (вибіркових розчинників). Рідинну екстракцію потрібно розглядати як один з основних методів розділення однорідних рідких сумішей [47].

Екстракція буде проходити в рідинному екстракторі одноступінчасто, як на рис.3.4.

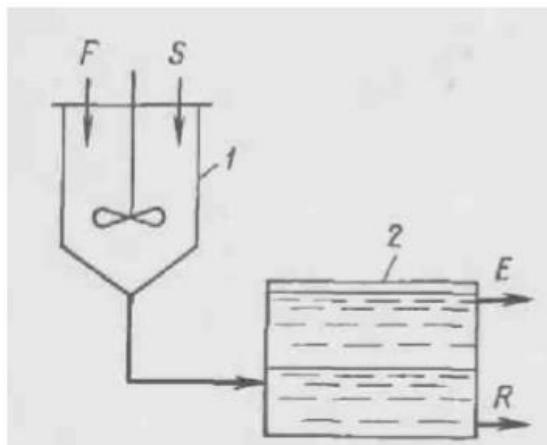


Рис.3.4. Схема одноступінчастої екстракції [47].

Вихідний розчин F і екстрагент S перемішують у змішувачі 1, після чого у відстійнику 2 розділяють на два шари: екстракт E і рафінат R .

Враховуючи втрати на етапі сепарування, кількість супернатанту сягає – 140 л. Внаслідок розведення органічними розчинниками (етилацетатом та ізопропанолом), кількість продукту становитиме 280 л. Найоптимальнішим варіантом для цього процесу буде використати екстрактор з робочим об'ємом 500 л. У виробника обладнання NORMIT знаходимо екстрактор періодичної дії з мішалкою з робочим об'ємом 650 л та потужністю електродвигуна приводу мішалки 5 кВт (рис 3.5.) [48].



Рис.3.5. Екстрактор NORMIT [48]

Після екстрагування, органічний екстракт міститься у верхній фазі, а нижня фаза - водна. Відбувається саме так, бо водна фаза має вищу густину. У води густина становить 997 кг/м^3 , в той час коли густина етилацетату на ізопропанолу – 902 та 786 кг/м^3 відповідно. Після завершення процесу водна фаза зливається першою на знешкодження, після чого через інший трубопровід органічний екстракт подається на вакуум випарювання.

На даному етапі враховуємо витрати, що будуть рівні 10%. Після екстракції у нас залишається приблизно **130 л** софороліпідів з органічними домішками в розчиннику. Для видалення органічних розчинників та концентрування розчину проводять **вакуумне випарювання** на вакуумному випарювачі SM-VE 2000, SAR MAKİNA, об'ємом 200 л (рис.3.6) [49]. Після випарювання (розчин упарюється на 50% та ще 5% становлять втрати) залишиться близько **60 л** концентрату.



Рис.3.6. Вакуумний випарювач [49]

Наступним етапом очищення софороліпідів в роботі [41] вказано видалення залишків олії за допомогою гексану. За даними літературного джерела [50] дане очищення проводиться саме після екстрагування та необхідне задля видалення залишків олії, яка використовується як джерело вуглецю при культивуванні продуцента цільового продукту. Також гексан володіє асептичними властивостями.

Для того, щоб очистити концентрат (якого залишилось приблизно 50 л) гексаном, буде використано екстрактор подібний до такого ж на попередній стадії, але менший - у виробника обладнання NORMIT знаходимо екстрактор періодичної дії з мішалкою з робочим об'ємом 200 л та потужністю електродвигуна приводу мішалки 5 кВт (рис 3.5.)

Після екстракції, суміш розділиться в верхній фазі буде органічний розчинник з залишками олії (густина гексану – 655 кг/м^3), в нижній (водній) фазі будуть безпосередньо міститись софороліпіди. Втрати на даному етапі становлять 5-10 %. Тож через трубопровід зливаємо та направляємо нижню фазу (55 л) на наступний етап очищення. А гексан направляємо на регенерацію.

3.3.3. Очищення цільового продукту

У нашому випадку даного очищення недостатньо для повного виділення ПАР та одержання високоочищених препаратів. На теперішній час широко застосовуються багатоступеневі схеми, що включають кілька послідовних етапів концентрування культуральної рідини (її супернатанту) та очищення ПАР від супутніх домішок. Така схема дає змогу одержувати поверхнево-активні препарати різного ступеня чистоти. Так, наприклад, сконцентрована культуральна рідина або неочищені препарати ПАР, одержані на перших стадіях технологічного процесу, характеризуються низькою вартістю і можуть використовуватися у нафтовидобувній, текстильній галузях та для очищення екосистем від нафтових забруднень. Натомість високоочищені препарати ПАР, що застосовуються виключно у фармацевтичній, харчовій, косметичній промисловості, можуть бути одержані в результаті додаткових етапів очищення вихідних напівпродуктів [45].

Тому для софороліпідів, що будуть використовуватись в косметичній галузі необхідне додаткове очищення.

В науковій роботі 2021 року [51] під час пошуку швидких та ефективних способів очищення гліколіпідів, вдалось досягнути 94% очищення софороліпідів за рахунок проведення твердофазної екстракції.

Як сорбент в даній роботі, для одержання високочистого продукту, використовували C18 (виробництва Phenomenex Strata) [51]. Strata C18 - це сорбент на основі кремнезему (по типу силікагелю), що забезпечує вилучення гідрофобних або полярних органічних молекул з водних матриць. Крім того, сорбенти Strata виготовляються з найвищою чистотою і проходять ретельні випробування [52].

Для даного методу очищення обрали серед промислових колонок, розроблених **Amersham Biosciences AB** (рис.3.7), представлених великим різноманіттям моделей, які використовуються в очищенні білків, нуклеїнових кислот, антитіл, пептидів і інших органічних сполук.

Системи ÄKTAprocess (Cytiva) цього виробника відрізняються один від одного, основним чином по продуктивності: 4-180 л/год, 13-600 л/год і 45-1800 л/год. До цих систем можна додатково підключати датчики тиску, температури та рН.

Наш вибір зупинився на колонці **BPG** [53]

- Корпус колони — скло;
- діаметр, мм — 446;
- довжина, мм — 1000;
- об'єм, л. — 131;
- максимальний тиск, бар — 8.



Рис.3.7. Системи ÄKTAprocess (Cytiva) з колонами **BPG** [53].

На обрану колону нашарувати сорбент та пропустити розчин через нього розчин софороліпідів. Сорбент на основі кремнезему зв'язує молекули софороліпідів, а інші органічні залишки проходять далі з розчином.

Для того, щоб елюювати (тобто відділити від сорбента) цільовий продукт в якості елюєнта буде використано розчин ацетонітрилу в воді – співвідношення ацетонітрил вода – 3:1 [51]. Тобто слідом після пропускання розчину через сорбент буде відбуватися елююція цільового продукту органічним розчинником – розчином ацетонітрилолу в кількості **50 л**. Розчин елюєнту готується в окремому збірнику, змішується 12,5 л води та 37,5 л ацетонітрилу.

Випарювання даного органічного розчинника для відділення від цільового продукту буде проведене в, ідентичному до уже використовуваного на даному підприємстві, вакуумному випарювачі SM-VE 2000, SAR MAKİNA, об'ємом 200 л (рис.3.6) [49]. На попередньому етапі втрати склали 10%, тож на випарювання направиться 50 л суміші софороліпідів з розчинником. В випарювачі речовина упарюється на 50-60% та ще 5-10% втрат. Далі випарений концентрат (**20 л**) направляється на висушування.

У промисловості застосовується безліч обладнання для висушування речовин. Сушарки бувають: вальцові, розпилювальні, стрічкові, сублімаційні тощо.

Вони розрізняються за способом сушіння, температурними режимами, теплоносіями, часом, продуктивністю, і т. д. (табл. 3.5).

Порівняльна характеристика висушувальних установок

Таблиця 3.5

Апарат	Технічні характеристики	Переваги	Недоліки
Вальцові та стрічкові сушарки [54]	Температура 70-80 °C	Ідеально для висушування пастоподібних субстанцій	Термолабільні речовини при такому висушуванні руйнуються
Розпилююча сушарка [55].	Продуктивність - 192 кг/год, Час безперервного висушування сягає 20год.	Розпилювальні сушарки мають м'які режими сушіння, що попереджують втрати БАР. Тут можливе суміщення тихих процесів як висушування та мікрокапсулювання.	Призначені для рідин (якщо в'язкий розчин- низька швидкість процесу сушіння)
Сублімаційні сушарки [56].	Максимальне завантаження продукту - 20 кг, Час висушування становить 24-48 год	Процес упарювання за низької температури, отже, не руйнуються білки, БАР. Окиснення нестабільних речовин не відбувається.	Підготовка препарату до сушіння повинна бути дуже ретельною, для повного висихання необхідне високий вакуум, сам процес досить тривалий і енерговитратний, дорогавартісний.

Закінчення таблиці 3.5.

Вакуум-сушильна шафа [57].	Максимальна температура 200°C; Продуктивність до 100 кг/год Час висушування - 20год.	Висока швидкість сушіння, висока продуктивність	Неможливість проведення безперервних процесів
----------------------------	--	---	---

Сушильна вакуумна шафа СВ-150 призначена для висушування або витримки в умовах вакууму. Основний продукт сушіння - це термічно нестійкі речовини як у формі порошку, так і пасти. Також шафа підходить для сушіння речовин, що легко розкладаються та легко окислюються або мають розчинники. Вакуумні сушильні шафи використовуються для сушіння в фармацевтичній, хімічній, науково-виробничій, аграрній та ветеринарній галузях. Нагрівання в шафі здійснюється внаслідок передачі тепла від полиці на деко з продуктом. Шафа обладнана сучасною мікропроцесорною системою контролю температури та часу, звуковою й візуальною сигналізацією про порушення процесу висушування. Кожна програма дозволяє встановити до 32-х сегментів процесу сушки з різними температурними режимами протягом певного проміжку часу, що дозволяє мінімізувати втручання оператора. Вакуумна шафа працює з обов'язковим підключенням до вакуумного насоса. Є можливість додаткового підключення пастки парів для збору конденсату парів продукту [57].



Рис.3.8. Шафа сушильна вакуумна СВ-150 [57].

Після висушування сухий залишок (**12 кг**) (при висушуванні втрати склали 40%). Направляється на дробіння. Дробарка шнекова ВВ-50 для лабораторного призначення, [Retsch](#) (Німеччина). Продуктивність – 10 кг/год , об'єм прийомної камери – 3 л; потужність електродвигуна -1,1 кВт (Рис.3.9) [58].



Рис.3.9. Дробарка

Далі готовий очищений цільовий продукт зважується та відправляється на аналіз, після чого на пакування та маркування.

Підсумовуючи все викладене та обґрунтоване раніше складено узагальнену схему виділення та очищення софороліпідів (рис.3.10).

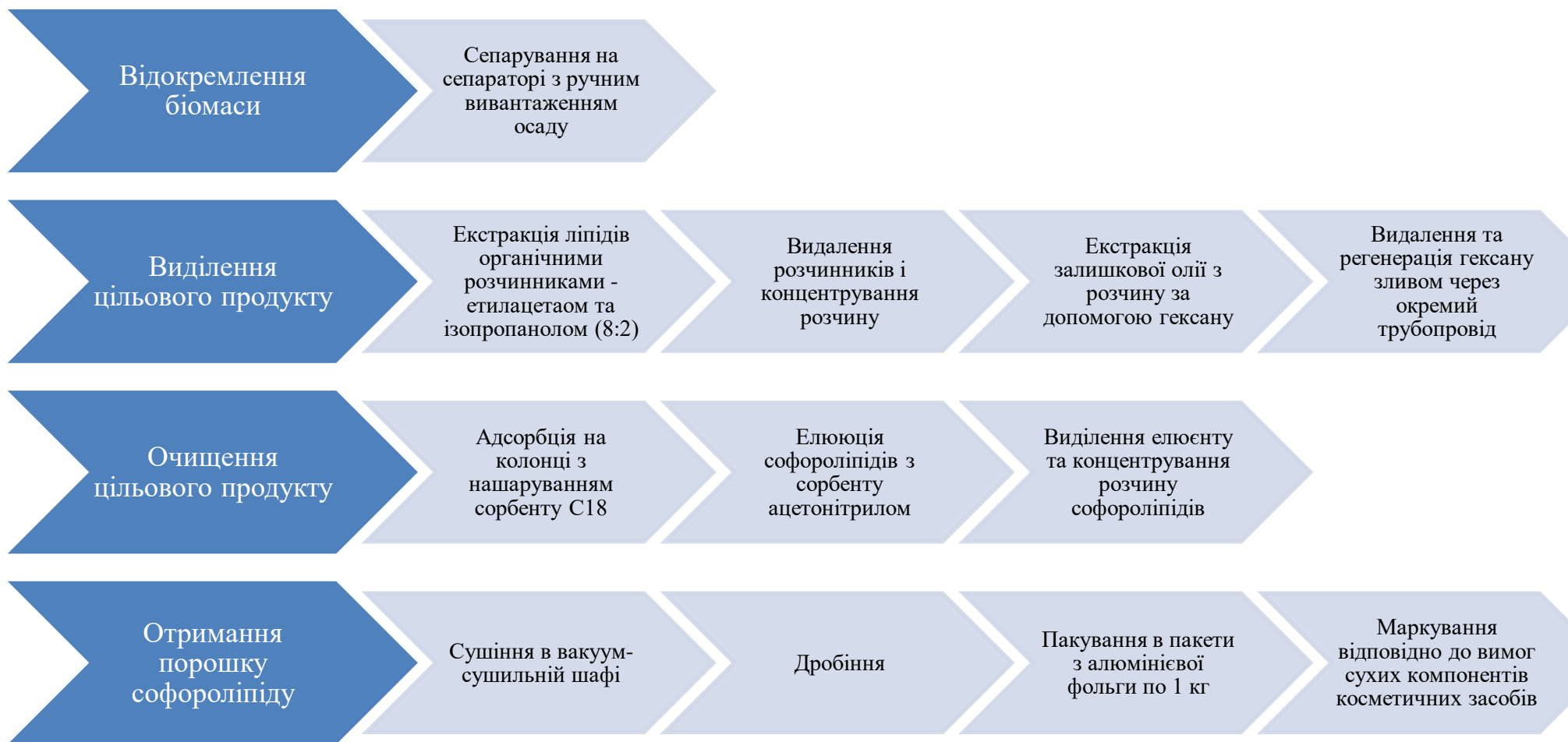


Рис. 3.10. Узагальнена схема виділення та очищення софороліпідів

3.4. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання готового продукту.

Відповідно до нормативно-технічної документації емульсійні косметичні креми повинні мати довготривалу стабільність при визначеній температурі (креми закордонного виробництва - від +40 до -10 ° С, креми вітчизняного виробництва - від +25 до + 5 ° С; ГОСТ-29189-91: термін придатності кремів - 12 місяців). Виконання цих вимог забезпечується наявністю стабілізуючих добавок, які забезпечують, так як було зазначено вище – фізичну та хімічну а також мікробіологічну стабільність емульсій, при цьому багато в чому така стабільність визначається технологією виробництва. Найважливішим фактором, що забезпечують стабільність системи, виступає оптимальна дисперсність та гомогенність системи. Вказані вимоги можуть бути виконані технологічним шляхом за допомогою процесів емульгування і гомогенізації [59].

Технологічні операції процесу виробництва кремів:

- - Підготовка компонентів крему;
- - Емульгування;
- - Охолодження емульсії;
- - Введення термолабільних БАВ;
- - Парфумування;
- - Пластична обробка;
- - Фасування й упакування крему.

Для **приготування водної фази** в реакторі, що обладнаний мішалкою та сорочкою розчинюються водорозчинні компоненти основи.

Важливою стадією в технології отримання м'яких лікарських форм є підготовка масляної фази, тобто **розплавлення компонентів вуглеводневої**

суміші масляної фази. В залежності від фармакологічної дії МЛФ застосовуються гідрофобні, гідрофільні основи та їх суміші. значення і роль основ в технології виробництва МЛФ важливі і різноманітні. Основи забезпечують необхідну масу кремів і, відповідно, належну концентрацію лікарських речовин, м'яку консистенцію, істотно впливають на їх стабільність. Ступінь вивільнення лікарських речовин з кремів, швидкість і повнота їх всмоктування багато в чому залежать від природи, складу і властивостей основи [60]. Для плавлення компонентів вуглеводневої суміші використовують реактори з обігрівом сорочки до 100⁰С.

Водна та жирова фаза подається на наступний важливий етап – емульгування. Оптимальний розмір частинок емульсійних кремів 1 -2 мкм. Креми, розмір частинок яких перевищує 2-3 мкм, будуть характеризуватись матовістю, схильністю до розшарування, крупчастістю. Креми, дисперсність яких сильно нижче 1 мкм, характеризуються підвищеною чутливістю до низьких температур. Саме тому, щоб врегулювати дисперсність і проводять ультразвукове емульгування.

Ультразвуковий гомогенізатор Sonochemical Pilot Machine 20kHz 3000watt Power Ultrasonic Cavitation Equipment [61] може створювати молекули від мікрона до нанорозміру. Використовується для емульгування олії та води, дисперсії тверда та рідина, дифузії клітин. Обраний апарат з продуктивністю 30 л/г зображений на рис. 3.11.



Рис. 3.11. Емульгатор Sonochemical Pilot Machine 20kHz 3000watt Power
Ultrasonic Cavitation Equipment [61]

До емульгатора з мірників подається жирова сировина та розчинені компоненти в гарячій воді з температурою 70 °С. Суміш в апараті підігрівається до температури 70–75 °С і за інтенсивного перемішування емульгується впродовж 10–15 хвилин.

Далі емульсія насосом перекачується в котел-холодильник, що оснащений сорочкою і мішалкою. Охолодження необхідно проводити повільно та поступово впродовж 20–30 хв і лише після досягнення температури 40–45 °С можна вводити вітаміни, віддушку та нарешті **софороліпід**и. Далі емульсію охолоджують до температури 30–32 °С.

Для косметичних кремів на основі емульсій обов'язковою є стадія **пластичної обробки**, що може досягатись двома способами: протирання на ситах чи обробка на вальцьових машинах.

Вальцьова машина (мазер) – це система з трьох валків, що контактують один з одним, осі яких лежать в одній площині. Два крайніх валка притискаються до середніх пружин. Зазор між середнім і крайнім валками регулюється. Крем втирається в зону контакту рулонів. Подрібнений крем вискоблюють з рулону скребком, встановленим на корпусі мазера. Процес подрібнення проходить у три етапи. Мазер також обладнаний запобіжним пристроєм, який автоматично зупиняє його, коли сторонні предмети потрапляють в проміжки між валками. Продуктивність трохроликового мазера становить близько 50 кг крему на годину [62].

Після охолодження суміш насосом перекачується до бункера прийому, що розташований над вальцовою машиною. В даному апараті суміш пройде пластичне оброблення. Три вальці нагріваються до температури 40–45 °С та проводиться подвійне вальцювання. Саме таке оброблення покращує емульгування, саму структуру крему та звісно його однорідність. Під час другого вальцювання температура вальців повинна становити 32–34 °С. Далі маса крему подається на фасування.

Фасування в банки відбувається на автоматичній лінії для фасування в баночки Твист ОФФ (рис. 3.12) [63]. Перед закриванням кришки "твист офф" відбувається попереднє вакуумування скляної банки, заповненої кремом. Для нанесення етикетки на бокову поверхню баночки, або на кришку "твист офф" окремо можлива установка аплікатора (для етикеток). Базовий варіант обладнаний магазином-накопичувачем для кришок "Твист Офф" [63].

Контрольні параметрів та критичні контрольні параметри зображені на діаграмі Ішикави (рис 3.13)



Рис.3.12. Автомат для фасування в баночки Твист ОФФ [63]

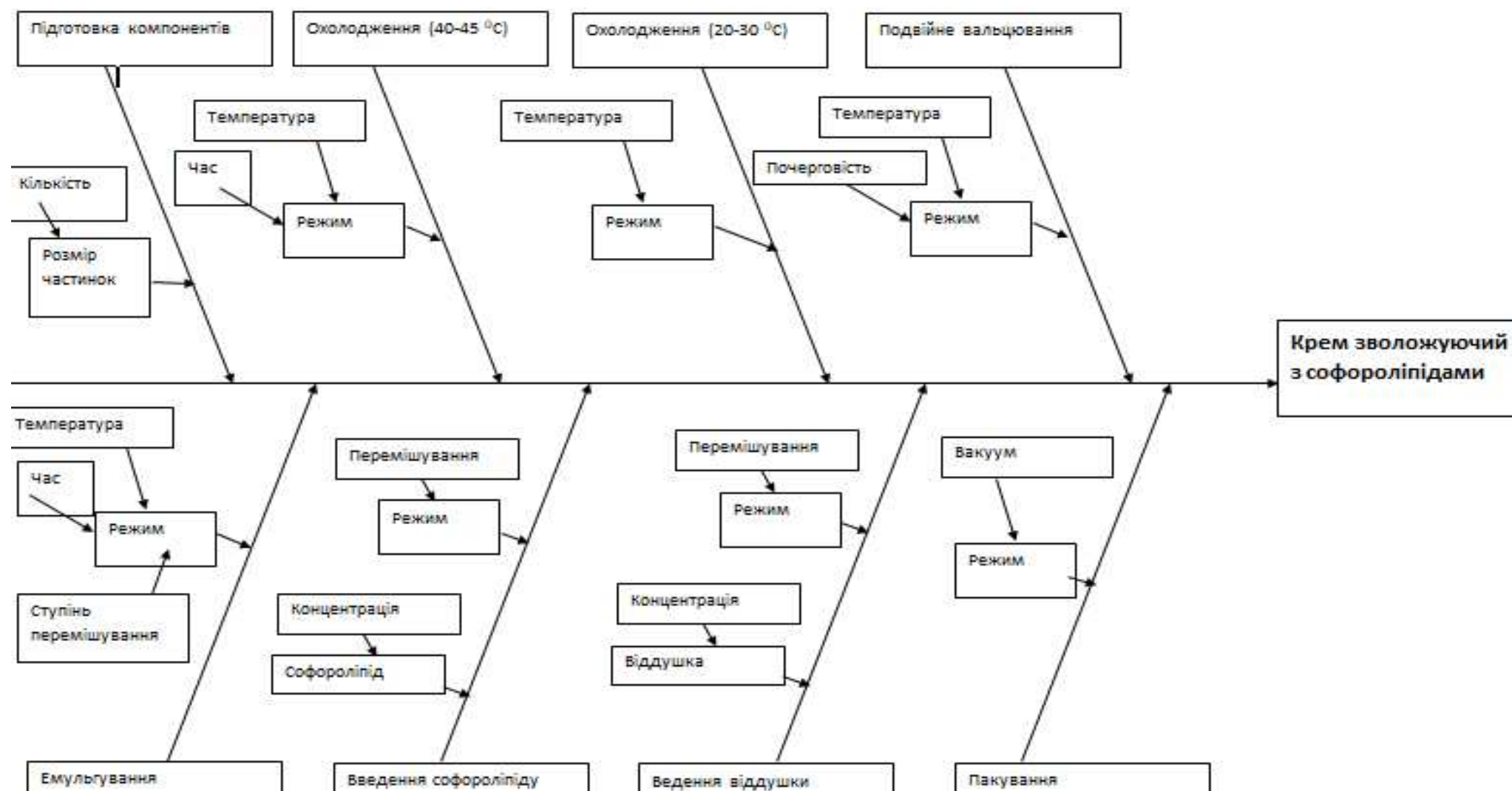


Рис 3.13. Діаграма Ішикави

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ			Літ.		Арк.	Акрушів	
Розроб.	Зварич А.О.									69	25	
Перевір.	Пирог Т.П.											
Реценз.	Пасічник Ю.В.							Кафедра БТМ				
Н. Контр.												
Затверд.	Пирог Т.П.											

Продовження таблиці 4.1.

ПЗ-7	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник А1И 019.000-01 Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». Повітрозабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень ⁶
Ф-8	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G3. Фільтруючий матеріал – скловолокно, Площа фільтруючої поверхні 0,48 м ² , продуктивність 2800 м ³ /год (0,78 м ³ /с) Виробник: Компанія «Фармстрой», Росія ⁶
К-9	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). ⁶
Т-10	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁶
Р-11	Ресивер	1	Ресивер Р 270.600. Об'єм 270 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «ДНТ-Прайм Група компаній, ООО» (Росія). ⁸
Т-12	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁶
Ф-13	Головний фільтр очистки	1	Фільтр (Р)–GSL N. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁷
Р-15	Реактор-змішувач для композиції середовища	1	Реактор-змішувач об'ємом 3 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³

Продовження таблиці 4.1.

Н-17 Н-24	Насос перестатичний	2	Перистальтичний шланговий насос ВНЗ-V, Santoprene® (Італія) ¹⁰
ЗП-18	Засівний пристрій	1	Засівний пристрій для подачі посівного матеріалу вирощеного в колбах на качалках
ІН-19	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 3 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-300 об/хв), сталь 316L. Виробник: «BIORUS» (Росія) ⁹ .
Ф-16 Ф-20 Ф-23 Ф-26 Ф-32 Ф-35 Ф-37	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр повітряний <i>Ultradept HPSRF</i> . Фільтруючий матеріал - боросилікат, діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %.. Виробник: «Donaldson» (США). ⁷
Р-22	Реактор-змішувач для композиції середовища	1	Реактор-змішувач об'ємом 30 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ІН-25	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 30 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником і турбінною мішалкою (50-800 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник «BIORUS» (Росія) ⁹ .
Р-28	Реактор-змішувач для композиції солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 300 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³ .

Продовження таблиці 4.1.

P-31	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12X18H10T. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
P-34	Реактор-змішувач для стерилізації олії строфи	1	Реактор-змішувач об'ємом 30 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР-36	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 300 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і перемішуючим пристроєм (до 200 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: «BIORUS» (Росія) ⁹ .
Виділення та очищення софороліпідів			
3-37	Збірник об'ємом 300 л для культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 300 л, виконаний на замовлення в «Хіммікс» (Україна); робочий об'єм 200 л; діаметр 0,35, висота 0,7 м; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100-120 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт ¹⁰
3-40	Збірник об'ємом 300 л для екстрагентів	1	
3-47	Збірник для гексану	1	
3-49	Збірник для ацетонітрилу	1	
C-38	Сепаратор	1	Сепаратор ОВІР-0,15М виробництва «ХолодПрофі» (Росія), розділювач напівзакритого типу з ручною періодичною вилученням осадку. Ширина 750 мм, висота – 900 мм. Продуктивність від 100 до 200 л/год ¹¹

Продовження таблиці 4.1.

Н-39 Н-43 Н-48 Н-52	Насос кулачковий	4	Насос кулачковий ВЗ-ОРА-2 «МТС Полтава» (Україна). Максимальний тиск – до 0,2 мПА, продуктивність 0,5-2 м3/год ¹²
Д-41 Д-46 Д-50	Дозатори	3	Дозатор сипучих матеріалів об'ємом 0,6 м ³ (Україна). Мінімальна межа дозування – 200 г, максимальна – 50 кг. Розміри: 870*870*2100 мм. Дискретність – 0,005 г ¹³
Е-42 Е-45	Екстрактор	2	Екстрактор виконаний на замовлення в Агромаш (Росія) обсягом 650 л. Потужність електродвигуна приводу мішалки– 5 кВт. Тривалість екстракції – 120-200 хв. Продуктивність – 150 л/год ¹⁴ Екстрактор виконаний на замовлення в Агромаш (Росія) обсягом 300 л. Потужність електродвигуна приводу мішалки– 5 кВт. Тривалість екстракції – 120-200 хв. Продуктивність – 50 л/год ¹⁴
В-44 В-53	Вакуумний випаровувач	2	Вакуумний випаровувач SM-VE 2000, SAR MAKİNA (Україна). Виконаний із сталі 316L, об'єм– 200 л. Температурні режими випарювання – 45-72°C ¹⁵
К-51	Колонка з нашаруванням сорбенту	1	Колонка об'ємом 130 л (Росія). Скляний корпус колони, діаметр – 446 мм, довжина – 1000 мм, На колонку нашаровано сорбент С18, максимальний тиск – 8 бар. Продуктивність 50 л/год ¹⁶ .
Т-54 Т-56	Тара	2	Тара виконана з нержавіючої сталі AISI 304, призначена для зберігання та транспортування рідин, обладнана зливним штуцером та заливним штуцером об'ємом 75 л. Вага – 5 кг. ¹⁷

Продовження таблиці 4.1.

BC-55	Вакуум-сушильна шафа	1	Шафа сушильна вакуумна СВ-150. Габаритні розміри, мм - 700x869x921. Повний об'єм камери – 150л. Продуктивність – 20кг/год ¹⁸ .
Д-57	Дробарка	1	Дробарка шнекова ВВ-50 для лабораторного призначення, Retsch (Німеччина). Продуктивність – 10 кг/год , об'єм прийомної камери – 3 л; потужність електродвигуна -1,1 кВт ¹⁹ .
Виробництво крему			
Р-58; Р-60; Р-65	Реактор	3	Реактор-змішувач об'ємом 100 л (2 шт) та 200 л, оснащений сорочкою, регулятором температури та перемішувальним пристроєм (100-450 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
Д-59; Д-61; Д-63; Д-66	Дозатор	4	Технічні та лабораторні ваги для дозування компонентів середовищ та «Вімолу» для приготування мийного засобу. Виробник: «Химтест» (Україна). ²
Е-62	Емульгатор ультразвуковий	1	Емульгатор ультразвуковий Sonochemical Pilot Machine 20kHz 3000watt Power Ultrasonic Cavitation Equipment. Потужність: 3000 Вт Напруга: 220В Температура: 300°C Тиск: 35 МПа Інтенсивність звуку:>60w/cm ² Максимальна продуктивність:> 30 л/хв Матеріал головки наконечника: титановий сплав (Китай) ²⁰

Закінчення таблиці 4.1.

Н-64; Н-67	Насос кулачковий	1	Насос кулачковий ВЗ-ОРА-2 «МТС Полтава» (Україна). Максимальний тиск – до 0,2 мПА, продуктивність 0,5-2 м3/год ¹²
В-68	Вальцьовий мазер	1	Трьохвальцевий мазер, продуктивність 50 кг/год. Виробник: «Minipres» (Росія) ²¹
НВ-69	Насос вакуумний	1	Вакуумний насос VE 115 N VALUE (1 ступ.57 л/хв.). Виробник: «VALUE» (Китай) ²²
ФМ-70	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина. Автомат для фасування в баночки Твист ОФФ. Продуктивність – до 20 банок/год. Виробник: «Инта» (Україна) ²³

Примітка*: пошук та вибір обладнання здійснювали використовуючи наступні електронні джерела:

- 1 - <https://2723-ua.all.biz/>;
- 2- [https://chemtest.com.ua/ua/vesovoe_oborudovanie-ua](https://chemtest.com.ua/ua/vesovoe_oborudovanie-ua;);
- 3 - <https://biotechno.ru/>;
- 4 - <https://ziko.com.ua/>;
- 5 - www.debem.com.ua;
- 6 - <http://www.dalgakiran.com.ua>;
- 7 - <http://www.emea.donaldson.com>;
- 8 - <https://resiver.all.biz/resiver-r-270600-270-litrov-10-bar-g3418704>;
- 9 - <http://bio-rus.ru/> .
- 10 - <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/reaktor-500l-s-magnitnoj-meshalkoj>
- 11 - <https://hprofi.com/p48332614-separator-vysokozhirnyh-slivok.html>
- 12 - <https://mtsp.com.ua/catalog/product/nasos-rotornyj-v3-ora-2-19/>
- 13 - <https://artmash.ua/product/dozator-sypuchih-materialov-06-kub-m>.
- 14 – https://www.agro-mash.ru/new_ekstr_meshal.htm
- 15 – <https://flagma.ua/uk/vakuumny-vyparivatel-sm-ve-2000-sar-mak-na-o7339973.html>
- 16 – <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/hromatografiya-promyshlennaya/>
- 17 – <https://3316547.com.ua/ua/p1387360670-metallicheskaya-zhestyanaya-banka.html>
- 18 – <https://uoslab.com/sushylne-obladnannia/vakuumni-shafy/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-sv-150>

- 19 - <https://prom.ua/p108473343-laboratornaya-schekovaya-drobilka.html>
- 20 - <http://ua.ultrasoniccuttingsystem.com/ultrasonic-sonochemistry/sonochemical-pilot-machine-20khz-3000watt.html>
- 21 - <https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/pharmaceutical-production-technologies/homogenization-of-ointments/>
- 22 - <https://prom.ua/ua/p470855729-vakuumnij-nasos-115.html?&primelead=M14x>
- 23 - <https://inta.org.ua/avtomaticheskaya-ustanovka-av-tvist-off.html>

4.2. Опис технологічної схеми

Технологічна схема виробництва софороліпідів *Starmerella bombicola* NBRC 10243 включає допоміжні роботи такі як санітарна підготовка виробництва, підготовка титрувальних агентів, аераційного повітря, а також поживних середовищ) та сам технологічний процес (біосинтез, виділення та очищення софороліпідів та приготування емульсійного крему).

Технологічна схема біосинтезу софороліпідів, їх виділення, очищення та приготування крему наведено у графічній частині кваліфікаційної роботи.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування розчину засобу «Вітол»

Розчин дезінфікуючого мийного засобу «Вітол» концентрацією 1 % призначеного для миття обладнання готують в збірнику. Даний збірник оснащений сорочкою, яка забезпечує підігрівання розчину мийного засобу до оптимальної температури – 70-80 °C. Після 10 хвилин перемішування одержуємо готовий розчин для миття обладнання, який використовується на наступних стадіях: ДР 1.2.1, ДР 1.2.2 та ДР 1.3.1. За допомогою СІП-мойки даний розчин розпилюється та забезпечує продуктивність процесу.

ДР 1.2.2. Приготування дезінфікуючого розчину «Хлорантоїн»

Миючий розчин Хлорантоїну для генерального прибирання готують в збірнику об'ємом 60 л. Такий збірник оснащений сорочкою, яка забезпечує підігрівання розчину до температури миття – 70-80 °С. Після 10 хвилин перемішування отримаємо готовий розчин, після чого його охолоджують та використовують за призначенням.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень

Щоденне прибирання приміщень, таке як миття підлоги, проводиться кожного дня за допомогою вологого способу. При цьому із всіх приміщень видаляють готову продукцію, відходи виробництва, напівпродукти, та невикористані матеріали. Миючі розчини після відпрацювання надходять до знешкодження відходів (ЗВ 14.1).

Для контролю чистоти приміщень проводиться мікробіологічний аналіз ($KУО < 800/см^2$).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Генеральне прибирання проводиться раз на місяць чи у разі потреби бактеріолога у тому випадку коли виявлена мікробна контамінація. Для обробки використовується 0,2 % розчин засобу «Хлорантоїн» (від ДР 1.1.2). Для того, щоб знезаразити повітря після генерального прибирання вмикаються бактерицидні лампи.

Перед тим як змінити миючий засіб проводиться мікробіологічний контроль ($KУО < 300/см^2$), для того щоб пересвідчитись в ефективності нового засобу. Відпрацьовані розчини направляються до знешкодження відходів (до ЗВ 7.1).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання

Миття обладнання здійснюється автоматизовано, за допомогою СП-мойки, при цьому витрачено буде миючого засібу 20% від геометричного об'єму обладнання. Обробку проводиться 15-20 хвилин, далі відпрацьований розчин подається на відновлення або зливається (ЗВ 7.1). Після такої обробки обладнання промивають за допомогою питної води, таким же чином, потім вода направляється на переробку.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування обладнання обов'язково проводиться візуальний технічний огляд для того, щоб виявити неущільнення в комунікаціях та запірній апаратурі безпосередньо на обладнанні. Для усунення неущільнень проводиться підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

Необхідно закрити усю запірну арматуру габаритного обладнання і подат аераційне повітря до рівня надлишкового тиску ($P = 0,1-0,2$ МПа). Далі потрібно перекрити вентиль подачі повітря та зафіксувати показання манометра та час витримки (приблизно 30-60 хв) в операційному журналі. Апарат можна вважати герметичним, якщо рівень падіння тиску не перевищуватиме 0,01 МПа. Якщо показники інші то здійснюють пошук неущільнень використовуючи галогенові течієпошукачі.

В апарат необхідно внести невелику кількість леткої галогенвмісної речовини (в нашому випадку чотирихлористий карбон – CCl_4), знову закрити усю запірну арматуру. Апарат нагріти до температури 80 °C і збільшити тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини будуть проникати через неущільнення і виявлятися у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції приблизно 1,5-2 год. У разі виявлення не ущільнень необхідно їх ліквідувати – а саме підтягують різьбове з'єднання чи міняють ущільнюючу прокладку.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації апарата в сорочку необхідно подати глуху пару і нагріти апарат до 80-90°C. Далі відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях, а також підведених до апарата комунікаціях та подають насичену пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, також відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для того щоб видалити повітря з апарату. За досягнення температури стерилізації 125-131°C всю запірну арматуру, не враховуючи парову, закривають і витримують впродовж 1 години. Після витримування необхідно закрити запірну арматуру подачі пари в апарат, потім подати стерильне повітря, а в цей час в сорочку подається холодна вода. Процес охолодження необхідно здійснювати до досягнення температури 30-40°C та надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

ДР 1.4.1 Навчання персоналу

Весь персонал, включно з людьми, зайнятими складанням і технічним обслуговуванням, має проходити систематичне навчання про правильне виробництво продукції в асептичних умовах, про гігієну та основи мікробіології.

ДР 1.4.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Для миття рук, персонал повинен використовувати туалетне чи господарське мило, в той час як для дезінфекції – 76% етиловий спирт.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають безпосередньо через повітрозбірник, який розташований на висоті 7 м.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Повітря пропускають через фільтр, набитий скловолокном, в якому відбувається відділення крупних часток бруду та затримання пилу, до ступеня очищення 75%.

ДР 2.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається у компресорі до тиску 0,4 МПа, температура повітря піднімається від 120 до 250°C.

ДР 2.4. Охолодження і видалення вологи

Після компресування збільшується вміст вологи у повітрі, щоб вивести вологу повітря охолоджують до 18-19°C у теплообміннику. Подальша подача повітря відбувається до ресивера, в якому відділяється зайва волога до вмісту $W=60\%$.

ДР 2.5. Підігрів повітря

Для зниження ризику конденсації вологи на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, повітря підігрівається у теплообміннику-нагрівачі до температури 30-35°C.

ДР 2.6. Тонке очищення повітря

Далі очищення повітря від мікроорганізмів відбувається в головному фільтрі. Ступінь очищення становить 95 %. Очищене повітря подається на індивідуальні фільтри.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним інокулятором і виробничим ферментером та перед збірниками, що містять стерильні розчини, установлюють індивідуальні фільтри. Якщо використовувати як фільтруючий матеріал боросилікат, ступінь очищення становить $E=99,999\%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6% розчину HCl

У засівну колбу об'ємом 1 л подають 335 мл питної води. Далі за постійного перемішування вносять 65 мл 37% розчину HCl.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH

На технічних вагах зважують 24 г NaOH, який вносять у засівну колбу об'ємом 1 л, додають 376 мл питної води за постійного перемішування 50 – 100 об/хв. Після повного розчинення проводиться стерилізація в автоклаві при 131⁰С упродовж 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На першій стадії необхідно приготувати 160 мл поживного середовища (але готується 200 мл поживного середовища, щоб заповнити 2 колби). Вміст компонентів для приготування 200 мл середовища наведений в табл. 4.2.

На технічних вагах зважують 2 г глюкози, 0,6 г дріжджового автолізу, 0,6 г пептону, 0,6 г мальтозного екстракту. Наважки вносять в колбу об'ємом 0,5 л, додають 200 мл дистильованої води, перемішують, а колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 112⁰С упродовж 30хв.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 200 мл середовища

Компонент поживного середовища	Кількість для робочого об'єму 200 мл, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	2	А	200

Дріжджовий автолізат	0,6		
Пептон	0,6		
Мальтозний екстракт	0,6		
Вода	200		
Разом	200		200

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 3 л

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 1,8 л поживного середовища. Зазначимо, що 10% (0,2 л) це посівний матеріал, а ще 10% - це конденсат, що утворюється за стерилізації середовища в реакторі.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,8 л середовища

Компонент поживного середовища	Кількість для робочого об'єму 2 л, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	А	1 798
Дріжджовий автолізат	6		
Пептон	6		
Мальтозний екстракт	6		
Вода	1 600		
Конденсат	160		
Разом	1 800		1 798

На технічних вагах зважують 20 г глюкози, 6 г дріжджового автолізу, 6 г пептону, 6 г мальтозного екстракту. Наважки вносять у реактор об'ємом 3 л. Далі за постійного перемішування 50-100 об/хв подають через лічильник води 1,6 л питної води. Стерилізують композицію подачею гострої пари 112⁰С упродовж 30 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 30 л

На даному етапі необхідно 17,5 л поживного середовища. Нагадаємо, що 10% припадає на посівний матеріал, а ще 10% - це конденсат.

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 17,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Кількість для робочого об'єму 19,2 л, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	192	А	17 504,8
Дріжджовий автолізат	57,6		
Пептон	57,6		
Мальтозний екстракт	57,6		
Вода	15 540		
Конденсат	1 600		
Разом	17 500		17 504,8

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 192 г глюкози, 57,6 г дріжджового автолізу, 57,6 г пептону, 57,6 г мальтозного екстракту. Наважки вносять у збірник об'ємом 30 л. Далі за постійного перемішування 50-100 об/хв подають через

лічильник води 15,54 л питної води. Стерилізують композицію подачею гострої пари 112⁰С упродовж 30 хв.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу софоролінідів в ферментаторі 300 л

На даній стадії необхідно 174,2 л поживного середовища. Нагадаємо, що 10% (17,5 л) припадає на посівний матеріал, а ще 10% – це конденсат.

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора в збірник об'ємом 30 л вносять 19,2 л олії ятрофи. Стерилізують при температурі 120⁰С упродовж 120хв.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 9 600 г глюкози та 576 г дріжджового автолізу. Наважки вносять у збірник об'ємом 50 л. Далі за постійного перемішування 50-100 об/хв подають через лічильник води 18 л питної води. Стерилізують композицію подачею гострої пари 112⁰С упродовж 30 хв.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 192 г сечовини, 96 г MgSO₄ · 7 H₂O, 19,2 г NaCl та 192 г KН₂РO₄ . Наважки вносять у збірник об'ємом 300 л. Далі за постійного перемішування 50-100 об/хв подають через лічильник води 112 л питної води. Для кращого розчинення до сорочки збірника подається пара для досягнення температури в збірнику 40⁰С. Після розчинення компоненти композиції Б подаються в ферментер об'ємом 300 л, де підкислюються 6%-вим розчином НСІ (від ДР 3.1.3) до рН 4,0 – 4,5. Стерилізують композицію за допомогою подачі гострої пари 131⁰С упродовж 40 хв.

Таблиця 4.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 174,2 л середовища

Компонент поживного середовища	Кількість для робочого об'єму 192 л, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л
Олія ятрофи	19 200	А	19 200
Глюкоза	9 600	Б	30 000
Дріжджовий автолізат	576		

Закінчення таблиці 4.5.

Вода	18 000		
Конденсат	1824		
Сечовина	192	В	125 000
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	96		
NaCl	19,2		
KH ₂ PO ₄	192		
Вода	112 000		
Конденсат	12 500		
Разом	174 200		174 200

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *S. bombicola* NBRC 10243 зберігають у пробірках зі скошеним сусло агаром. Кожні 3-4 місяці необхідно здійснювати пересіви. Завжди при роботі з колекційною культурою необхідно дотримуватись асептичних умов.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Для того, щоб отримати робочу культуру, необхідно колекційну культуру, яка зберігається в пробірках з скошеним поживним середовищем розсіяти петлею на чашки Петрі з сусло агаром до ізольованих колоній, вирощуючи при температурі 30⁰С 48 год.

Ізольовані колонії треба пересівати петлею в пробірки зі скошеним сусло агаром, зазначимо, що одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки. Використовуються колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість вирощування становить 24 год за 30⁰С.

ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Колбу з композицією А (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах необхідно розлити по 100 мл в качалочні колби об'ємом 750 мл.

До пробірки з робочою культурою *S. bombicola* NBRC 10243, що вирощена на сусло агарі, вносять 5 мл стерильної води, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію та вносять у колби з поживним середовищем. Важливо, для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану лише з однієї пробірки. Вирощують культуру при 200 об/хв. упродовж 72 год за 25⁰С.

По закінченню процесу проводиться мікробіологічний аналіз культуральної рідини кожної колби та визначається концентрація біомаси, що повинна становити 20 г/л.

Після проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал з колб вносять в одну стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.4. Вирощування культури в посівному апараті 3 л

В посівний апарат подається перекачуванням насосом композиція А (від ДР 4.2.1) та вноситься через засівну колбу посівний матеріал (від ТП 5.3). Тривалість культивування складає 72 год при 25⁰С, швидкість обертів мішалки 500 об/хв., рН 7.

Кожні 4 години з інокулятора необхідно відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, що для посівного матеріалу на 72 годину культивування має становити 20 г/л, концентрації джерела вуглецю і азоту.

ТП 5.5. Вирощування культури в посівному апараті 30 л

В посівний апарат подається через насос композиція А (від ДР 4.3.1) та вноситься самотоком посівний матеріал (від ТП 5.4).

Тривалість культивування складає 72 год при 25⁰С, швидкість обертів мішалки 500 об/хв., рН 7.

Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини задля мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, що для посівного матеріалу на 72 годину культивування повинна становити 20 г/л, концентрації джерела вуглецю та азот.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 300 л. В ферментер, з композицією В (від ДР 4.4.3) подають самотоком через гребінку композицію А (від ДР 4.4.1) та композицію Б (від ДР 4.4.2). Для нейтралізації середовища безпосередньо в ферментер подають 6%-вий розчин NaOH (від ДР 3.2), після чого вносять через насос посівний матеріал (від ТП 5.5).

Тривалість культивування складає 168 год при 25⁰С за постійної аерації, швидкість обертів мішалки 500 об/хв., рН 7.

Кожні 4 години з ферментера відбирають проби культуральної рідини задля мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, що для посівного матеріалу на 168 годину культивування повинна становити 30 г/л, концентрації джерела вуглецю та азоту. Також, обов'язково в кінці ферментації проводиться контроль концентрації софороліпідів (122 г/л).

ТП 7. Відділення біомаси.

ТП 7.1. Сепарування

Культуральна рідина після культивування направляється в збірник З-37, після чого самотпливом направляється до сепаратора С-38, де проходить процес відділення біомаси від супернатанту. Сепарування триває 30 хв при 6500 об/хв. Відділений супернатант поступає до ТП 8.

ТП 8. Виділення цільового продукту

ТП 8.1. Екстракція

Супернатант через насос Н-39 надходить до екстрактора Е-42. В збірник 3-40 через дозатор Д-41 подається суміш екстрагенту – етилацетат та ізопропанол в співвідношенні 8:2 відповідно, отже подається 112 л етилацетату та 28 л ізопропанолу. Супернатант подається в патрубок вихідного розчину, тоді як суміш екстрагентів самотоком подається в патрубок екстрагенту.

ТП 8.2. Відділення водної фази

Після закінчення процесу нижню фракцію (водну) зливаємо через нижній патрубок та подаємо на знешкодження ЗВ, верхню фракцію за допомогою насосу Н-43 подаємо до ТП 8.3. Для реєстрації розподілу фаз екстрактор оснащений рівнеміром.

ТП 8.3. Видалення розчинників та концентрування розчину вакуум-випаровуванням

Вмикаємо вакуумний випарювач В-44 та подаємо верхню фракцію після екстракції за допомогою насосу Н-43 для видалення екстрагентів та концентрування розчину. Після випарювання подаємо концентрат до ТП 8.4.

ТП 8.4. Екстракція залишкової олії гексаном

Концентрат подається самотоком безпосередньо в екстрактор Е-45, куди зі збірника 3-47 (дозатор Д-46) подається 50 л гексану. Вмикається об'ємний екстрактор.

ТП. 8.5. Відділення органічного розчинника

Нижня фракція (водна фаза) від ТП 8.4. після розділення фаз подається на ТП 9. Органічний розчинник (верхня фракція) подається на регенерацію. Для реєстрації розподілу фаз екстрактор оснащений рівнеміром.

ТП 9. Очищення цільового продукту

ТП 9.1. Адсорбція

Через насос Н-48 з екстрактора Е-45 на колонку К-51 з нашарованим сорбентом для адсорбції потрапляє розчин софороліпідів.

ТП 9.2. Елююція цільового продукту ацетонітрилом

Через дозатор Д-50 в збірник З-49 потрапляє 37,5 л ацетонітрилу та 12,5 л води. Далі розчин ацетонітрилу самотоком направляється в К-51 для елююції цільового продукту.

ТП 9.3. Видалення елюєнта та концентрування розчину вакуум-випарюванням

Вмикаємо вакуумний випарювач В-53 та подаємо ацетонітрил з вимитим софороліпідом за допомогою насосу Н-52 для видалення елюєнту. Після випарювання подаємо концентрат до ТП 10.

ТП 10. Отримання порошку софороліпиду

ТП 10.1. Сушіння

Концентрат з ТП 9.4 переносимо за допомогою тари Т-54 до вакуум сушильної шафи ВС-55. Температура сушіння – 40-50⁰С Вмикаємо шафу і починається просушування субстанції. Після висушування порошок вручну за допомогою сталльної тари Т-56 переносять до ТП 10.2.

ТП 10.2. Дробіння

Вмикаємо дробарку Д-57 та подрібнюємо сухий залишок після сушіння. Після закінчення процесу, діаметр подрібнених частинок порошкоподібної речовини мусить сягати - 0,5-1 мм. Отриманий порошок направляємо на ПМВ 10.3.

ПМВ 10.3. Пакування

Пакування проводиться вручну. Порошок запаковують в герметичні пакети з алюмінієвою фольгою по 1 кг. Запакований порошок направляється на ПМВ 10.4.

ПМВ 10.4. Маркування

Маркування відбувається вручну у відповідності до встановлених вимог.

ТП 11. Підготовка сировина для одержання крему

ТП 11.1. Плавлення твердої основи

В реактор Р-58 через дозатор Д-59 подаються вуглеводневі, нерозчинні в воді, компоненти основи крему. В даному реакторі, що обладнаний сорочкою та мішалкою при температурі 80-100 °С плавляться жирові компоненти масляної фази. Розплавлена маса з температурою 70 °С подається до *ТП 12.1.*

ТП 11.2. Розчинення водорозчинних компонентів крему

В реактор Р-60 через дозатор Д-61 подається вода та розчинні в ній компоненти крему. Вмикається мішалка та починається нагрівання суміші до 40 °С, а перед подачею до *ТП 12.1.* суміш нагрівається до 70 °С.

ТП 12. Одержання крему

ТП 12.1. Ультразвукове емульгування

В емульгатор Е-62 подається масляна фаза від *ТП 11.1.* та водна фаза від *ТП 11.2.*, а також через Д-63 подаються інші компоненти крему. Суміш піддається нагріванню до температури 70–75 °С і за інтенсивного перемішування емульгується протягом 10–15 хвилин. Суміш після емульгування подається через насос Н-64 до *ТП 12.2.*

ТП 12.2. Охолодження в котлі-холодильнику

Через насос Н-64 від *ТП 12.1* подається маса крему до котла-холодильника (реактора, обладнаного мішалкою та сорочкою для охолодження)

Р-65. Охолодження обов'язково проводиться повільно і поступово (20–30 хв) і лише після досягнення температури 40–45 °С через дозатор Д-66 вводяться софороліпіди та віддушка. Лише після цього емульсію охолоджують до температури 30–32 °С. Далі емульсія направляється до *ТП 12.3*.

ТП 12.3. Гомогенізація крему на трьохвальцевому мазері

Емульсія від *ТП 12.2* подається через насос Н-67 до вальцьового мазера В-68. Вальці нагріваються до температури 40–45 °С. Подвійне пластичне оброблення поліпшує саме емульгування, структуру крему та звідси його однорідність. При другому вальцюванні температура вальців повинна бути в межах 32–34 °С. Після цього маса крему подається до *ТП 13.1*.

ТП 13. Фасування та пакування

ТП 13.1. Фасування крему в баночки

Через вакуумний насос НВ-69 крем подається на фасування. Фасування в банки відбувається на автоматичній лінії для фасування в баночки Твист ОФФ ФМ-70. Перед закриванням кришки "твист офф" відбувається попереднє вакуумування скляної банки, заповненої кремом. Для нанесення етикетки на бокову поверхню баночки, або на кришку "твист офф" окремо установлений аплікатор (для етикеток). Банки наповнені кремом відправляються на пакування до *ТП 13.2*.

ТП 13.2. Пакування готового продукту

Пакування банок в картонні ящики відбувається вручну.

ЗВ 14. Знешкодження відходів

ЗВ 14.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів від *ДР 1.2.1*, *ДР 1.2.2*, *ДР 1.3.1* необхідно знешкодити, їх направляють на очисні споруди. Оскільки до стічних вод відносяться, в основному води після миття і ополіскування, обладнання і

приміщень, то обираємо комбінаційне поєднання механічного, хімічного і біотехнологічного способу очистки.

На механічній стадії очистки, СВ необхідно пропустити через металеві сита з дрібним плетінням задля затримання твердих частинок і великих нерозчинних часток.

Отриманий фільтрат після механічного очищення необхідно подаєти на стадію хімічної очистки, на якій неорганічні та частково органічні сполуки, що містяться у СВ – залишки поживного середовища.

На цьому етапі використовуються біофільтри. Залежно від фізико-хімічної оцінки вод можуть бути використані наступні групи мікроорганізмів як активна складова на біофільтрах:

- Аеробні грам негативні, паличкоподібні нітробактерії-нітрифікатори. Серед них найбільш поширені – *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosolobus* (перетворювачі амонійного азоту), та *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* (перетворювачі нітритів);

- Грамнегативні, паличкоподібні сіркобактерії *Thiobacillus*, *Thiotrics*, *Bequatio*, які беруть участь в очищенні стічних вод, внаслідок їх життєдіяльності утворюється сірчаний колчедан, тож відбувається перетворення нерозчинних мінеральних солей – фосфатів;

Таким чином знешкоджені стічні води, з виробництва, є екологічно безпечними і можуть бути подані як в навколишнє середовище, так і на доочищення на полях фільтрації.

ЗВ 14.2. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря, що надходить від посівних апаратів та ферментера (від ТП 5.4, ТП 5.5 та ТП 6.1) направляється у системи очищення повітряних відходів.

Для очищення повітряногазових відходів пропонується використати оптимальний термічний метод – спалювання газу.

Цей метод має широке розповсюдження, так як відсутнє шлакове господарство й стічні води, невеликі розміри установок, простота в обслуговуванні і можливість автоматизації процесу за високої ефективності та невеликих затратах.

Для реалізації даного методу можна використати комбіновану установку знешкодження газових викидів. Така установка двохступінчата. На першому ступені виконується термічне знешкодження відходів тобто спалювання, на другому відбувається більш глибоке каталітичне знешкодження.

РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

5.1. Контроль виробничого біосинтезу

Впродовж культивування кожні 8 год необхідно відбирати проби культуральної рідини (не беручи до уваги етап підготовки посівного матеріалу в колбах на качалках, де проба відбирається після культивування) для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю (олія строфи та глюкоза) і азоту (карбамід).

5.1.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється за допомогою розсіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопуванням (див. рис.5.1). Попередньо відібрану культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з сусло агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для виявлення дріжджів і грибів [64].

Колонії *S. bombycola* NBRC 10243 білувато-кремові, мають округлу форму, опуклі, блискучі (див. рис.5.1). В світловому мікроскопі форма клітин циліндрична, довгаста, рідше овальна, довжина 4 – 18, діаметр 2 – 4 мкм.



Рис.5.1. Культура *S. bombycola* NBRC 10243 – колонії на агаризованому середовищі;

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Зварич А.О.					94	9
Перевір.		Пирог Т.П.						
Реценз.		Пасічник Ю.В.						
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

5.1.2. Показники росту і синтезу

Концентрація біомаси. Біомасу визначають за допомогою оптичної густини клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [64].

Концентрація софороліпиду

Концентрацію софороліпідів в супернатанті можна визначити ваговим методом після триразової екстракції етилацетатом.

Для того, щоб отримати супернатант клітини відділяють від культуральної рідини за допомогою центрифугування за 5000 обертів 45 хвилин.

Екстракцію проводять таким чином: для екстракції у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл вносять 25 мл супернатанту і 25 мл етилацетату, воронку закривають пришліфованою пробкою та струшують (відбувається цедля екстракції ліпідів) впродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають в воронці задля розділення фаз, далі нижню фракцію збирають (органічний екстракт 1), а водну фазу піддають повторній екстракції, так само як описано вище. Після розділення фаз зливають нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі здійснюють екстракцію, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують та упарюють на роторній випарній установці за температурі 50°C та абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси [6].

Концентрація джерела вуглецю.

Глюкоза. Кількість глюкози вимірювали за калібрувальним графіком після рефрактометричного аналізу.

Олія ятрофи. Залишкову кількість олії в культуральній рідині визначають ваговим методом після трикратної екстракції гексаном чи петролейним ефіром (за співвідношенням 1:1) з наступним упарюванням органічного екстракту у вакуумі за 40 °C до постійної маси [65].

Концентрація азоту. Спектрофотометричне визначення сечовини в супернатанті за використання наночастинок срібла (AgNPs).

При взаємодії карбаміду з AgNPs утворюється сполука, чію оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі.

Схема реакції наведена на рис.5.2.

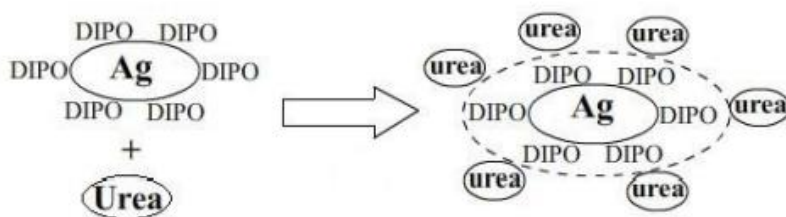


Рис.5.2. Схема реакції за визначення вмісту карбаміду: реакція наночастинок срібла та карбаміду

AgNPs готують шляхом хімічного відновлення AgNO_3 гіdraзином, використовуючи 1,3-ді-(1H-імідазол-1-іл)-2-пропанол (DIPO) як стабілізуючий агент у водному середовищі [66] .

10 мл AgNPs (1 мМ) змішують з 10 мл супернатанту і струшують протягом 15 хв при кімнатній температурі. Постійно перевіряється УФ-видимим спектрофотометричним скануванням в діапазоні 300-800 нм відносно чистого реагента. Концентрацію карбаміду можна визначити за калібрувальним графіком.

5.2. Контроль виділення та очищення софороліпідів

Основні точки контролю процесу виділення наведено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
К _Т 1.1 Сепарування	Розчин, швидкість обертання, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	n=6500 об/ хв τ = 30 хв
К _Х К _Т 2.1 Екстрагування	Розчин, кількість екстрагенту, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	τ = 120-200 хв C=45-50%
К _Т 3.1 Випаровування	Розчин, температура процесу, час процесу	Датчик Годинник Термометр	Під час процесу	τ = 200-300 хв T = 55-60 °C
К _Т 4.1 Екстрагування гексаном	Розчин, кількість екстрагенту, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	τ = 120-200 хв C=45-50%
К _Т 5.1 Адсорбція	Розчин Час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	τ = 120-200 хв
К _Т 6.1 Випарювання	Розчин, температура процесу, час процесу	Термометр Годинник	Під час процесу	τ = 200-300 хв T = 50-55 °C
К _Т 7.1 Сушіння	Температура процесу, час процесу	Термометр Годинник	Під час процесу	τ = 200-300 хв T = 80-85 °C
К _Т 8.1 Дробіння	Вологість продукту Візуальний вигляд Час процесу	Аналізатор вологості	До початку процесу та під час процесу	W=10%

5.2.1. Методи контролю кінцевого продукту

Ідентифікація софороліпідів.

Очищений продукт софороліпідів за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі спочатку ідентифікується та охарактеризовується за допомогою FTIR (спектрофотометр PerkinElmer Spectrum-One, США). У той час як подальшу характеристику біоповірхнево-активної речовини проводять за допомогою ^1H NMR з використанням CDCl_3 (Mercury Plus 400 NMR спектрометр, Varian, США), остаточну характеристику проводили за допомогою маспектрометру (Q-TOF PremierTM, Waters, США). Для маспектрометричного аналізу датчик ESI, підключений до Micromass ZMD, служив режимом негативних іонів (Рис. 5.3) [41].



Рис. 5.3. Мас-спектрометр

Визначення мінімального поверхневого натягу та міжфазного натягу.

Мінімальний поверхневий натяг та міжфазний натяг суміші SLs у дослідженні оцінювали за допомогою поверхневого тензіометра (DCAT 11, Dataphysics Instruments, Німеччина), оснащеного блоком дозування рідини (LDU, Dataphysics Instruments, Німеччина) що працює за принципом методу пластин Вільгельмі. Використана пластина Вільгельмі була довжиною 10 мм, шириною 19,9 мм і товщиною 0,2 мм. Розчин частково очищених софороліпідів

(200 мг/л) готували у надчистій воді та вимірювали поверхневий натяг при 25 °С. Значення мінімального поверхневого натягу розраховували із співвідношення між концентрацією софороліпідів та відповідним поверхневим натягом. Вимірювання міжфазного натягу проводили відносно н-гексану, соняшникової та оливкової олії. Усі вимірювання поверхневого/міжфазного натягу були виконані у трьохразово, а результати були середніми показниками потрійного аналізу [41].

Емульгуюча активність і стабільність.

Емульгуючу активність та стабільність виділених та очищених СЛ перевіряли з використанням різних органічних розчинників, а саме 1-гексадецену, бензолу, парафіну легкого, ізопропілміристату та гасової олії за модифікованою методикою Cirigliano та Carman [67]. Коротко, 1 мл зразка, що містить софололіпід (0,5 мг/мл), змішували з 1 мл будь-якого олійного субстрату, після чого суміш енергійно струшували у вихровому міксері протягом 2 хв і залишали на 10 хв. вимірюючи його кінцеве поглинання при 600 нм. Таким чином, емульгувальну активність виражали як поглинання суміші при 600 нм (A600) [67]. Стабільність отриманої емульсії була виражена як константа розпаду (kd), оцінена з лінійного співвідношення між поглинанням (A600) і часом (дні), як представлено в наступному рівнянні:

$$\log A600 = -k_d \times t$$

Визначення вмісту вологи

Суха речовина перед пакуванням в індивідуальну упаковку повинна відповідати певним вимогам, наприклад, вологість такої речовини не повинна складати більше 10%. Вологість вимірюється ваговим методом після висушування (різниця між масою наважки до і після висушування).

Зразковий (еталонний) метод - двоступеневе висушування матеріалу спочатку при 105 °С і залишковому тиску не більшому, ніж 13,3 кПа (10 мм. рт. ст.), впродовж 30...50 хв та при 130 °С впродовж 1 год у зразковій вакуум-

тепловій установці ОВЗ-1. Метод найточніший, а розбіжність результатів аналізу між значеннями вологості не перевищує $\pm 0,10\%$ [68].

На виробництві вологу можна визначати аналізатором вологості, що працює за принципом дії гравіметричного методу [69].



Рис. 5.4. Аналізатор вологості

Антимікробні властивості

Антимікробні властивості софороліпідів аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації. Визначення мінімальної інгібуючої концентрації здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. Результати оцінювали візуально: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину софороліпиду визначали як середнє значення між концентраціями ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній, та в попередній, де він був наявний [70, 71].

Як тестові культури використовували *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 та *Aspergillus niger*. Проаналізувавши дані досліджень [72-75] в яких аналізували антимікробні властивості софороліпідів, зокрема вирощених на гідрофобних субстратах, можна зробити висновок, що

мінімальна інгубуюча концентрація софолодіпідів для бактерів повинна становити 2 мкг/мл а для грибів приблизно 20 мкг/мл.

5.3. Показники якості при стандартизації кремів косметичних [76]

1. Органолептичні показники:

а) Зовнішній вигляд (визначають на предметному склі або білому папері – однорідна маса без сторонніх включень);

б) Колір, запах (властиві крему даного найменування).

2. Фізико-хімічні показники:

а) Масова частка гліцерину (до 30%). Виміряно титруванням, методом зворотного йоду та контрольним експериментом. Крохмаль використовували як індикатор і додавали в кінці титрування. Титрувати до зникнення синього кольору.

б) Масова частка загальних основ в перерахунку на КОН (до 1%, залежно від типу крему). Для визначення кислотності вільну основу титрували фенолфталеїном, а потім зв'язану основу титрували метилоранжем.

в) Гідрогенний індекс (рН 5-9). Для кремів з масляно-водною емульсією рН визначають потенціометричним методом безпосередньо в кремі, а для кремів на основі олії або жиру - у 10-20% водному розчині шляхом нагрівання частини крему з водою до повного відділення шару. Після охолодження налейте водний шар у склянку і виміряйте рН розчину.

г) Колоїдна стабільність є важливим показником якості крему, що вказує на здатність крему не розділятися на жирову та водну фази протягом терміну придатності. Методи визначення колоїдної стабільності поділяються на: 1) довготривалий метод - спостерігається весь період крему протягом терміну придатності; 2) прискорений метод - це метод центрифугування, при якому крем при випробуванні не розділяють на жирову фазу і воду. на час фази центрифуги.

д) Термостабільність – метод визначення відсутності розшарування крему при дослідженні у різних температурних режимах: 7 діб у термостаті (40-45°C), потім 7 діб у холодильнику (10-12°C) та 3 доби при кімнатній температурі.

ВИСНОВКИ

1. В літературному огляді підсумовано та узагальнено літературні дані щодо біосинтезу софороліпідів та розглянуті властивості даних поверхнево-активних речовин. Детально розглянуто антимікробні, антифунгальні властивості та здатність до деструкції біоплівки. В огляді наведено порівняння між біосинтезом софороліпідів на різних складах поживного середовища. Наведена інформація про геномодифіковані штами та значимість даних поверхнево-активних речовин в промисловості, зокрем косметології.

2. Розроблено технологічну та апаратурну схему отримання цільового продукту під час культивування штаму *Starmerella bombicola* NBRC 10243 на середовищі де джерелом вуглецю виступає олія ятрофи.

3. Технологічний процес одержання культуральної рідини з софороліпідами складається з допоміжних (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, приготування розчинів титрувальних агентів, приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу та для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 300 л) і основних робіт, що включають в себе вирощування посівного матеріалу і сам виробничий біосинтез. Технологія отримання препарату передбачає періодичне культивування штаму продуцента глибинним способом.

4. Розроблений сучасний метод очищення софороліпідів для подальшого використання в доглядовій косметиці, який полягає у зв'язуванні софороліпідів на сорбенті Strata C18 (сорбент на основі кремнезему), що забезпечує вилучення гідрофобно-гідрофільних молекул цільового продукту з водних матриць з наступною їх елюцією ацетонітрилом.

5. Описано безпосереднє одержання емульсійного крему (підготовка компонентів, емульгування, охолодження, гомогенізація, фасування та пакування) та наведено даний процес в апаратурній та технологічних схемах.

6. Отримані софороліпіди контролюють такими методами контролю: високоефективна рідинна хроматографія з подальшим використанням та

масспектрометрії, також вимірювання поверхневого натягу та емульгувальних властивостей.

7. Отож, розроблена загальна схема одержання зволожуючого крему з софороліпідами, починаючи від мікробного біосинтезу даних поверхнево-активних речовин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ito S., Inoue S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 43(6): 1278-83. doi: 10.1128/AEM.43.6.1278-1283.1982
2. Takahashi, M., Morita, T., Wada, K., Hirose, N., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, D. Production of Sophorolipid Glycolipid Biosurfactants from Sugarcane Molasses Using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *Journal of Oleo Science.* 2011; 60(5): 267–273. doi:10.5650/jos.60.267.
3. Vedaraman, N., Venkatesh, N. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. *Polish Journal of Chemical Technology.* 2010; 12(2). doi:10.2478/v10026-010-0011-4
4. Bajaj, V. K., Annapure, U. S. Castor Oil as Secondary Carbon Source for Production of Sophorolipids Using *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069. *Journal of Oleo Science.* 2015; 64(3): 315–323. doi:10.5650/jos.ess14214
5. Konishi, M., Yoshida, Y., Horiuchi, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2015; 119(3): 317–322. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.08.007
6. Imura, T., Kawamura, D., Morita, T., Sato, S., Fukuoka, T., Yamagata, Y., Kitamoto, D. Production of Sophorolipids from Non-edible Jatropha Oil by *Starmerella bombicola* NBRC 10243 and Evaluation of their Interfacial Properties. *Journal of Oleo Science.* 2013; 62(10): 857–864. doi:10.5650/jos.62.857
7. Xiao-jing M., Hui-min Z., Xu-feng L., Jian H., Hui-xia Z., Huai W., Ri-sheng Y. Mutant breeding of *Starmerella bombicola* by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) for improved production of specific or total sophorolipids. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 2020; doi: 10.1007/s0044 9-020-02377 -7

8. Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. *Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by Lactobacillus paracasei. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2010; 76(1): 298–304. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.11.008
9. Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Uemura, S., Iwabuchi, H., Kitamoto, D. Selective Production of Acid-form Sophorolipids from Glycerol by *Candida floricola*. *Journal of Oleo Science.* 2017; 66(12): 1365–1373. doi:10.5650/jos.ess17116
10. Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Uemura, S., Iwabuchi, H., Kitamoto, D. Efficient Production of Acid-Form Sophorolipids from Waste Glycerol and Fatty Acid Methyl Esters by *Candida floricola*. *Journal of Oleo Science.* 2018; 67(4): 489–496. doi:10.5650/jos.ess17219
11. Mousavi, F., Beheshti-Maal, K., Massah, A. Production of Sophorolipid from an Identified Current Yeast, *Lachancea thermotolerans* BBMCZ7FA20, Isolated from Honey Bee. *Current Microbiology.* 2015; 71(2): 303–310. doi:10.1007/s00284-015-0841-7
12. Morya, V. K., Park, J., Kim, T. J., Jeon, S., Kim, E.-K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. *Bioresource Technology.* 2013; 143: 282–288. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.094
13. Ma, X., Li, H., Shao, L., Shen, J., Song, X. Effects of nitrogen sources on production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2011; 91(6): 1623–1632. doi:10.1007/s00253-011-3327-y
14. Chen, Y., Tian, X., Li, Q., Li, Y., Chu, J., Hang, H., Zhuang, Y. Target-site directed rational high-throughput screening system for high sophorolipids production by *Candida bombicola*. *Bioresource Technology.* 2020; 315: 123856. doi:10.1016/j.biortech.2020.123856
15. Van Bogaert, I. N. A., Holvoet, K., Roelants, S. L. K. W., Li, B., Lin, Y.-C., Van de Peer, Y., & Soetaert, W. (2013). The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. *Molecular Microbiology*, 88(3), 501–509. doi:10.1111/mmi.12200

16. Li, H., Ma, X., Shao, L., Shen, J., & Song, X. (2012). Enhancement of Sophorolipid Production of *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576 by Low-Energy Ion Beam Implantation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(3), 510–523. doi:10.1007/s12010-012-9664-1
17. Saerens, K. M. J., Saey, L., & Soetaert, W. (2011). *One-step production of unacetylated sophorolipids by an acetyltransferase negative Candida bombicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 2923–2931. doi:10.1002/bit.23248
18. Roelants, S. L. K. W., Ciesielska, K., De Maeseneire, S. L., Moens, H., Everaert, B., Verweire, S., ... Soetaert, W. (2015). *Towards the industrialization of new biosurfactants: Biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola**. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(3), 550–559. doi:10.1002/bit.25815
19. Singh, P., Cameotra, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*. 2004; 22(3): 142–146. doi:10.1016/j.tibtech.2004.01.010
20. Joshi-Navare, K., Prabhune, A. A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency. *BioMed Research International*. 2013; 1–8. doi:10.1155/2013/512495
21. Mani, P., Dineshkumar, G., Jayaseelan, T., Deepalakshmi, K., Ganesh Kumar, C., Senthil Balan, S. Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. *3 Biotech*. 2016; 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0478-7
22. Elshikh, M., Moya-Ramírez, I., Moens, H., Roelants, S., Soetaert, W., Marchant, R., Banat, I. M. Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: natural antimicrobial surfactants for oral hygiene. *Journal of Applied Microbiology*. 2017; 123(5): 1111–1123. doi:10.1111/jam.13550
23. Sen, S., Borah, S. N., Bora, A., Deka, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microbial Cell Factories*. 2017; 16(1). doi:10.1186/s12934-017-0711-z

24. Chen J., Liu X., Fu S., An Z., Feng Y., Wang R., Ji P. Effects of sophorolipids on fungal and oomycete pathogens in relation to pH solubility. *Journal of Applied Microbiology*. 2020; 128: 1754-1763. doi:10.1111/jam.14594
25. Pontes, C., Alves, M., Santos, C., Ribeiro, M. H., Gonçalves, L., Bettencourt, A. F., Ribeiro, I. A. C. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? *International Journal of Pharmaceutics*. 2016; 513(1-2): 697–708. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.074
26. Ceresa, C., Fracchia, L., Williams, M., Banat, I. M., Díaz De Rienzo, M. A. The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. *Journal of Biotechnology*. 2020; 309: 34–43. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.12.019
27. Ianieva O.D. Biosurfactant-producing yeasts isolated from flowering plants and bees. *Mikrobiol Z*. 2013; 75(4): 53–59.
28. Ianieva O.D. Characterization, stability and antimicrobial activity of biosurfactants produced by *Candida* yeasts isolated from flowering plants. *Mikrobiol Z*. 2019; 81(2): 51-64.
29. Van Bogaert, I. N. A., Saelens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 23–34. doi:10.1007/s00253-007-0988-7
30. Wadekar, S. D., Kale, S. B., Lali, A. M., Bhowmick, D. N., & Pratap, A. P. (2012). UTILIZATION OF SWEETWATER AS A COST-EFFECTIVE CARBON SOURCE FOR SOPHOROLIPIDS PRODUCTION BY *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(2), 125–142. doi:10.1080/10826068.2011.577883
31. Elazzazy, AM, Abdelmoneim, TS, & Almaghrabi, OA (2015). Виділення та характеристика виробництва біоповверхнево-активної речовини в екстремальних умовах навколишнього середовища лужно-галогенотермофільними бактеріями з Саудівської Аравії. Саудівський журнал біологічних наук, 22 (4), 466–475. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.11.018

32. Joshi-Navare, K., & Prabhune, A. (2013). A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency. *BioMed Research International*, 2013, 1–8. doi:10.1155/2013/512495
33. Díaz De Rienzo, M. A., Banat, I. M., Dolman, B., Winterburn, J., & Martin, P. J. (2015). Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnology*, 32(6), 720–726. doi:10.1016/j.nbt.2015.02.009
34. Lourith N., Kanlayavattanakul M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Society of Cosmetic Scientists and the Socié'te' Franc,aise de Cosme'tologie*. 2009; 31: 255–261. doi: 10.1111/j.1468-2494.2009.00493.x.
35. Adu A., Naughton J., Marchant R., Banat M. Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutics*. 2020; 12: 1099. doi:10.3390/pharmaceutics12111099
36. Аналіз ринку косметики в Україні. 2021 рік / Електронний ресурс. Режим доступу: <https://pro-consulting.ua/ua/issledovanie-rynka/analiz-rynka-kosmetiki-v-ukraine-2021-god>
37. Розподіл постійного населення України за статтю та віком на 1 січня 2019 року / Державна служба статистики України
38. Bireswar B., Tarun K. G., Nilimanka D. Application of Bio-Surfactants in Cosmetics and Pharmaceutical Industry. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*. 2017; 6(7): 320-329. doi:10.21276/sajp
39. Поліш Н. В., Марінцова Н. Г. Біогенні поверхнево-активні речовини як перспективні екологічно безпечні засоби для використання в агропромисловості та медицині // doi: 10.30525/978-9934-26-025-4-13
40. Кузнецова О.В., Лисицька С.М. Методичні вказівки до виконання практичних робіт з курсу. Вступ до фаху для студентів спеціальності «Промислова біотехнологія» усіх форм навчання. ДВНЗ УДХТУ. 2008. 45 ст.
41. Daverey, A., Pakshirajan, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 79(1): 246–253.
doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.00

42. Новиков Д.А. Виділення та очистка продуктів біотехнології
Методическое пособие – Минск.: БГУ. 2014. 256 ст.

43. Данилов І.П., Самійленко С.І. Апарати мікробіологічної
промисловості. Навч. посібник. – Харків : НТУ «ХПІ». 2008. 272 ст.

44. Сепаратор - ОВІР-0,15М . [Електронний ресурс]. - Режим доступу:
<https://hprofi.com/p48332614-separator-vysokozhirnyh-slivok.html>

45. Пирог, Т.П., Ігнатенко С.В., Тарасенко Д.О. Ключові проблеми
промислового одержання мікробних поверхнево-активних речовин. Харчова
промисловість, 2008, 7: 32-36.

46. Пирог Т.П., Ігнатенко С.В. Мікробні поверхнево-активні речовини:
мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва /
Біотехнологія, 2008, 1(4): 28-38.

47. Екстракція. [Електронний ресурс]. - Режим доступу:
<https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Processes-and-apparatus-of-chemical-productionLecture11.pdf>

48. Екстрактор періодичного типу з мішалкою. [Електронний ресурс]. -
Режим доступу: <https://normit.ru/product/otrasli/vinodelie/item/tekhnologicheskoe-oborudovanie-dlya-ekstraktsii-ekstragirovaniya>

49. Вакуумний випарювач - SM-VE 2000. [Електронний ресурс]. -
Режим доступу: <https://flagma.ua/uk/vakuumny-vyparivatel-sm-ve-2000-sar-mak-na-o7339973.html>

50. Bajaj, V., Tilay, A., Annapure, U. Enhanced Production of Bioactive
Sphorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by Design of Experiment
Approach with Successive Purification and Characterization. *Journal of Oleo
Science*, 2012, 61(7): 377–386. doi:10.5650/jos.61.377

51. Dardouri, M., Mendes, R. M., Frenzel, J., Costa, J., & Ribeiro, I. A.
C. Seeking faster, alternative methods for glycolipid biosurfactant characterization

and purification. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(16): 4311–4320. doi:10.1007/s00216-021-03387-4

52. Сорбент C18. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata>

53. Колонка для адсорбції. - [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/hromatografiya-promyshlennaya/>

54. Стрічкові сушарки. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://agrotimes.ua/article/strichkova-susharka/>

55. Кузнецова О.В., Лисицька С.М. Методичні вказівки до виконання практичних робіт з курсу. Вступ до фаху для студентів спеціальності «Промислова біотехнологія» усіх форм навчання. ДВНЗ УДХТУ. 2008. 45 ст.

56. Данилов І.П., Самійленко С.І. Апарати мікробіологічної промисловості. Навч. посібник. – Харків : НТУ «ХПІ». 2008. 272 ст.

57. Вакуумна шафа. Технічні характеристики. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://uoslab.com/sushylne-obladnannia/vakuumni-shafy/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-sv-150>

58. Дробарка. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://prom.ua/p108473343-laboratornaya-schekovaya-drobilka.html>

59. Морозова. Ю.Ю. Сучасні технологічні аспекти виробництва парфумерно-косметичних товарів. Формування механізмів управління якістю та підвищення конкурентоспроможності товарів і послуг. 2019. Ст. 62-65.

60. Долінський А.А., Горобець В.Г., Переяславцева О.О., Спосіб та обладнання для нагрівання і плавлення вуглеводневих сумішей у різних галузях промисловості (огляд)\\ *Теплофізика та теплоенергетика*, 2021, т. 43, №1.

61. Ультразвуковий емульгатор. Інтернет-ресурс. Режим доступу : <http://ua.ultrasoniccuttingsystem.com/ultrasonic-sonochemistry/sonochemical-pilot-machine-20khz-3000watt.html>

62. Трьохроликовий мазер. Інтернет-ресурс. Режим доступу : <https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/pharmaceutical-production-technologies/homogenization-of-ointments/>
63. Фасувальна машина. Інтернет-ресурс. Режим доступу : <https://inta.org.ua/avtomaticheskaya-ustanovka-av-tvist-off.html>
64. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М.. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / К.: НУХТ, 2014. – С. - 45.
65. Синтез мікробного полісахариду етаполану на олієвмісних промислових відходах : автореф. дис. ... канд. техн. наук : 03.00.20 "Біотехнологія" / М. О. Івахнюк ; Нац. ун-т харч. технол. - Київ, 2019. – 25 с.
66. Ali, N., Ismail, M., Khan, A., Khan, H., Haider, S., and Kamal, T. Spectrophotometric methods for the determination of urea in real samples using silver nanoparticles by standard addition and 2nd order derivative methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2018. – V. 189. – P. - 110–115.
67. Cirigliano M.C., Carman G.M., Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol*, 1984, 48: 747–750.
68. Паска М. З., Галух Б. І., Мартинюк І. О., Басараб І. М. Методи контролю харчових виробництв. Навч. посіб. / - Львів : ЛНУВМ та БТ імені С. З. Гжицького. 2012. 105 ст.
69. Аналізатор вологості. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://labimpex.com.ua/p59035899-analizator-vlazhnosti-radwag.html>
70. Elshikh, M., Moya-Ramírez, I., Moens, H., Roelants, S., Soetaert, W., Marchant, R., Banat, I. M. Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: natural antimicrobial surfactants for oral hygiene. *Journal of Applied Microbiology*. 2017, 123(5): 1111–1123. doi:10.1111/jam.13550

71. Пирог Т.П., Савенко І.В., Шевчук Т.А., Крутоус Н.В., Іутинська Г.О. Антимікробні властивості поверхневоактивних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. Мікробіол. журн., 2016, 78(3): 2-12.
72. Joshi-Navare, K., Prabhune, A. A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency. *BioMed Research International*. 2013: 1–8. doi:10.1155/2013/512495
73. Mani, P., Dineshkumar, G., Jayaseelan, T., Deepalakshmi, K., Ganesh Kumar, C., Senthil Balan, S. Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. *3 Biotech*. 2016, 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0478-7
74. Chen J., Liu X., Fu S., An Z., Feng Y., Wang R., Ji P. Effects of sophorolipids on fungal and oomycete pathogens in relation to pH solubility. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128: 1754-1763. doi:10.1111/jam.14594
75. Díaz De Rienzo M. A., Banat I. M., Dolman, B., Winterburn, J., Martin, P. J. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnology*, 2015, 32(6): 720–726. doi:10.1016/j.nbt.2015.02.009
76. Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів з фармацевтичної та косметичної хімії "Стандартизація, контроль якості та сертифікація парфумерно-косметичних засобів"