

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

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

<b>«До захисту в ЕК»</b>	<b>«До захисту допущено»</b>
Директор інституту (декан факультету)	Завідувач кафедри
_____	_____
(підпис)	(підпис)
_____ <u>Грегірчак Н.М.</u> _____	_____ <u>Пирог Т.П.</u> _____
(прізвище та ініціали)	(прізвище та ініціали)
« ____ » _____ 2020 р.	« ____ » _____ 2020 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності \_\_\_\_\_ 162 «Біотехнології та біоінженерія» \_\_\_\_\_  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми \_\_\_\_\_ «Біотехнологія» \_\_\_\_\_

на тему: \_\_\_\_\_ Біосинтез поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 для використання їх у складі мийно-дезінфікувальних засобів \_\_\_\_\_

Виконав: здобувач \_\_\_\_\_ IV курсу, групи \_\_\_\_\_ 1 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Царьова Анастасія Михайлівна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

Керівник \_\_\_\_\_ Пирог Тетяна Павлівна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) \_\_\_\_\_ (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_ Клименко О.М. \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)  
\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_ Ястремська Л.С. \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ  
Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь бакалавр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(шифр і назва)  
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»  
(назва)

### ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології  
Пирог Т.П.  
«17» березня 2020 року

### ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА Царьова Анастасія Михайлівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Біосинтез поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 для використання їх у складі мийно-дезінфікувальних засобів

керівник роботи Пирог Т.П., професор, д.б.н.,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Nocardia vaccinii* IMB В-7405, цільовий продукт: поверхнево-активні речовини

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Індукція синтезу і активності бактеріоцинів. РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень. РОЗДІЛ 3. Біологічна активність поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB В-7405, синтезованих в присутності дріжджових індукторів. РОЗДІЛ 4. Ділянка доферментаційних процесів та біосинтез поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB В-7405. РОЗДІЛ 5. Автоматизація ділянки виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва поверхнево-активних речовин – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва поверхнево-активних речовин – 1 аркуш формату А1. Схема автоматизації ділянки біосинтезу поверхнево-активних речовин – 1 аркуш формату А3.

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
5	Клименко Олег Миколайович, доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	11.05.2020

## 7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Індукція синтезу і активності бактеріоцинів	20.03.2020-30.03.2020	
2	Матеріали і методи досліджень	01.04.2020-11.04.2020	
3	Біологічна активність поверхнево-активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405, синтезованих в присутності дріжджових індукторів	12.04.2020-21.04.2020	
4	Ділянка доферментаційних процесів та біосинтез поверхнево-активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	22.04.2020-01.05.2020	
5	Автоматизація ділянки виробництва	02.05.2020-11.05.2020	
6	Оформлення пояснювальної записки	12.05.2020-22.05.2020	
7	Виконання графічної частини проекту	23.05.2020-31.05.2020	

Здобувач

\_\_\_\_\_ (підпис)

Царьова А.М.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

\_\_\_\_\_ (підпис)

Пирог Т.П.

(прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота присвячена дослідженню впливу внесення дріжджових індукторів в середовище культивування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на біологічні властивості синтезованих поверхнево-активних речовин.

В роботі описані отримані експериментальним шляхом дані щодо впливу індукторів на антимікробну активність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, а також на їх здатність руйнувати біоплівки. Експериментальні дані порівняні з результатами, отриманими на кафедрі біотехнології та мікробіології у попередні роки. Встановлено, що ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезовані за присутності *Candida utilis* БВС-65, , *Candida tropicalis* РЕ-2 виявляють антимікробну активність у декілька десятків разів вища, ніж активність тих самих ПАР, синтезованих за присутності бактеріальних індукторів (*E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2). Ступінь руйнування біоплівки також був значно вище (деструкція біоплівок *E. coli* ІЕМ-1 *B. subtilis* БТ-2 *Pseudomonas sp.* МІ-2 в роботі коливається в межах 78-92% за умови внесення бактеріальних індукторів, тоді як у наших дослідженнях більшість препаратів ПАР показали результат більш як 95% деструкції для всіх тест-культур)

На основі відомих даних щодо біологічних властивостей ПАР штаму ІМВ В-7405 було розроблено проект виробництва ПАР з метою використання їх у складі мийно-дезінфікувальних засобів для миття зерносховищ. Розрахована річна потужність виробництва з урахуванням втрат під час культивування: 48128 л розчину супернатанту.

Дипломна робота складається з 149 сторінок, 71 літературного джерела, 2 аркушів креслень формату А1

*Ключові слова: поверхнево-активні речовини, антимікробна активність, біоплівки, зерносховища*

## Зміст

РЕФЕРАТ .....	4
ВСТУП.....	10
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД .....	12
<b>РОЗДІЛ.1 ІНДУКЦІЯ СИНТЕЗУ І АКТИВНОСТІ БАКТЕРІОЦИНІВ</b> .....	12
<b>1.1. Мікроорганізми як біологічні індуктори</b> .....	13
<b>1.2. Хімічні речовини – індуктори синтезу та активності</b> <b>бактеріоцинів</b> .....	18
<b>1.3.Вплив рН на антимікробну активність бактеріоцинів</b> .....	29
<b>1.4. Вплив температури культивування на антимікробну</b> <b>активність бактеріоцинів</b> .....	31
<b>ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА</b> .....	34
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ</b> .....	34
<b>2.1.Об’єкт дослідження</b> .....	34
<b>2.2.Культивування <i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405 і підготовка індукторів</b>	34
<b>2.3. Виділення ПАР <i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405 з культуральної рідини,</b> <b>визначення концентрації та підготовка розчинів ПАР</b> .....	35
<b>2.4.Визначення антимікробної активності ПАР</b> .....	36
<b>2.5.Визначення ступеня руйнування біоплівки</b> .....	37
<b>2.6.Визначення антиадгезивної активності ПАР</b> .....	38
<b>РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ</b> <b>РЕЧОВИН <i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405, СИНТЕЗОВАНИХ В ПРИСУТНОСТІ</b> <b>ДРІЖДЖОВИХ ІНДУКТОРІВ</b> .....	40
<b>3.1.Вплив внесення біологічних індукторів на синтез ПАР</b> .....	40

**3.2. Вплив внесення дріжджів роду *Candida* на антимікробну активність ПАР ..... 41**

**3.3. Вплив внесення дріжджів роду *Candida* на здатність ПАР руйнувати біоплівки ..... 46**

**3.4. Вплив внесення біологічних індукторів на антиадгезивну активність ПАР ..... 50**

**ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА ..... 53**

**РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 ..... 53**

**4.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту та вибору поживного середовища для його культивування..... 53**

**4.2. Техніко-економічне обґрунтування..... 60**

**4.2.1 Потреба у цільовому продукті ..... 60**

**Загальна характеристика зерносховищ..... 60**

**Шкідники, що спричиняють псування зерна ..... 61**

**Антимікробна обробка зерносховищ..... 62**

**Засоби для дезінфекції зерносховищ..... 63**

**Переваги використання ПАР *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 у якості мийно-дезінфікуючих засобів для обробки елеваторів ..... 64**

**4.3 Розрахунок річної потреби ..... 65**

**4.3.1 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу ПАР *N.vaccinii* IMB B-7405 ..... 67**

**4.3.2. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері та інокуляторах ..... 69**

4.3.2.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для виробничого біосинтезу.....	69
4.3.2.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування інокуляту в посівному апараті для засіву ферментера об'ємом 1,5 м <sup>3</sup>	70
4.3.2.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для засіву інокулятора об'ємом 150 л .....	70
4.3.2.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для засіву інокулятора об'ємом 15 л .....	71
4.4. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва .....	71
4.4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	71
4.4.2. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікуювальних засобів .....	73
Габарити обладнання для виробництва культуральної рідини <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405 .....	73
Розрахунок загальної площі поверхонь виробничих приміщень для обробки мийними засобами .....	76
Розрахунок загальної площі, яка буде піддаватись обробці мийно-дезінфікуючими засобами під час виробництва ПАР <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405.....	77
Обґрунтування вибору мийно-дезінфікуючих засобів для обробки обладнання та приміщень при культивуванні <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405 .....	77
Узагальнена характеристика витрат мийно-дезінфікуючих засобів під час культивування <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405 .....	79
ДЕЗЕКОН <sup>1</sup> .....	79

4.4.3. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій .....	81
4.4.4. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря .	82
4.4.5 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища .....	83
Підготовка і стерилізація запасних розчинів .....	83
Вирощування інокуляту в колбах на качалках.....	84
Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л.....	84
Приготування поживного середовища в інокуляторі об'ємом 150 л .....	85
Приготування поживного середовища для біосинтезу ПАР <i>N. vaccinii</i> IMBV-7405 в ферментері об'ємом 1500 л .....	85
4.5.    Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу ПАР <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405 .....	87
4.5.1. Розрахунок кількості виробничих циклів .....	88
4.5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу	89
4.5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 5 м <sup>3</sup> ..	91
4.5.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 150 л. ....	93
4.5.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 15 л.	96
4.5.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках. ....	98

<b>4.6. Розрахунок матеріального балансу.....</b>	<b>100</b>
<b>4.7 Розрахунок технологічного обладнання .....</b>	<b>105</b>
<b>4.8. Специфікація обладнання .....</b>	<b>110</b>
<b>Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405.....</b>	<b>110</b>
<b>4.9. Опис технологічної схеми.....</b>	<b>114</b>
<b>4.10. Контроль виробництва комплексного мікробного препарату на основі <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405 .....</b>	<b>128</b>
<b>Карта постадійного контролю біосинтезу антимікробних поверхнево- активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405.....</b>	<b>129</b>
<b>4.10.1. Мікробіологічний контроль .....</b>	<b>135</b>
<b>4.10.2. Визначення показників росту і синтезу.....</b>	<b>136</b>
<b>РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА .....</b>	<b>138</b>
<b>5.1. Опис функціональної схеми автоматизації .....</b>	<b>140</b>
<b>5.2. Специфікація засобів автоматизації.....</b>	<b>141</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>143</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>144</b>

## ВСТУП

Однією з найбільших проблем сьогодення є поширення мікроорганізмів, резистентних до антибіотиків та інших антимікробних речовин, що входять до складу мийних засобів та антисептиків. Останні здобули назву «біоциди» згубно впливають на організм людини, тварин, а також на екологію в цілому [1]. Постійне використання антимікробних речовин у побуті, безконтрольне вживання антибіотиків значно пришвидшує появу нових резистентних штамів.

Основа сучасних мийно-дезінфікуючих засобів становлять поверхнево-активні речовини (хімічної природи), хлор, фенол, формальдегід, аміак, кислоти, луки, ензими, відбілювачі тощо. Леткі органічні сполуки подразнюють слизові оболонки очей і носа, викликаючи сльозотечу, нежить, утруднення дихання і кашель, аж до запалення бронхів і навіть нападів астми, деякі хімічні речовини призводять до розширення кровоносних судин мозку, що стає причиною нападів мігрені, також відомо про вплив таких речовин на систему травлення, вони викликають печію, нудоту та навіть важкі хімічні отруєння [2].

Саме тому виникає нагальна потреба пошуку нових ефективних антимікробних агентів, що будуть згубно впливати на ріст мікроорганізмів, і в той же час будуть безпечними для навколишнього середовища та людини. Так зростає інтерес до поверхнево-активних речовин як антимікробних агентів. Відомо, що ПАР мікробного походження мають ряд суттєвих переваг перед антимікробними синтетичними аналогами – вони біодеградабельні, нетоксичні, стійкі по відношенню до зміни температури та значення рН, екологічно безпечні [3].

					НУХТ БТЕК 04.01.01 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Царьова А.М.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	10	Пирог Т.П.					10	24
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Раніше на кафедрі біотехнології і мікробіології НУХТ із забруднених нафтою ґрунтів було виділено штам нафтоокиснювальних актинобактерій *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 і було встановлено його здатність до біосинтезу ПАР яким притаманна антимікробна та антиадгезивна активність [3,4]. Крім цього, дослідники встановили, що антимікробну активність ПАР штаму ІМВ В-7405 можна регулювати внесенням в середовище культивування конкурентних штамів мікроорганізмів [4].

У зв'язку з цим метою даної дипломної роботи є дослідження впливу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих на середовищі із внесенням дріжджових індукторів (дріжджі роду *Candida*), а також розробка апаратурної та технологічної схем виробництва ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 для використання їх у складі мийно-дезінфікуючих засобів.

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### РОЗДІЛ.1 ІНДУКЦІЯ СИНТЕЗУ І АКТИВНОСТІ БАКТЕРІОЦИНІВ

Однією з основних проблем сучасної медицини є антибіотикорезистентність мікроорганізмів, і як результат – неефективність дії протимікробних лікарських засобів [5]. Внаслідок цього виникає гостра необхідність пошуку і вивчення нових, альтернативних антибіотикам, антимікробних речовин.

Відомо, що бактеріоцини – одні з найрозповсюдженіших факторів бактеріального антагонізму, які виділяються більшістю видів мікроорганізмів і володіють бактерицидною дією по відношенню до філогенетично споріднених видів. Зважаючи на високу літичну активність та вузьку специфічність дії [6] зростає інтерес до використання бактеріоцинів як альтернативи антибіотикам.

В роботі [7] бактеріоцини описують як групу гетерогенних антибіотикоподібних речовин, переважно білкової природи, що синтезуються більшістю бактерій і характеризуються бактерицидною дією. Проте від антибіотиків їх відрізняє 3 основні властивості: синтез бактеріоцинів відбувається на рибосомах, володіють специфічним спектром дії, кожен бактеріоцин має свій власний спеціалізований імунний білок. [8]

Дослідження бактеріоцинів почалися в 1930-х роках з роботи по нізину продуцентом якого є лактокок *L. lactis subsp. lactis*, виділений з жіночого молока [7]. Станом на сьогодні вивчена і описана велика кількість бактеріоцинів, які синтезуються як грампозитивними так і грамнегативними мікроорганізмами. Серед продуцентів бактеріоцинів представники різних родів: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* та *Streptococcus*.

					НУХТ БТЕК 04.01.01 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Царьова А.М.			ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД. РОЗДІЛ 1. ІНДУКЦІЯ СИНТЕЗУ І АКТИВНОСТІ БАКТЕРІОЦИНІВ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	12	Пирог Т.П.					10	24
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Проте, аналізуючи літературу можна зробити висновок, що більшість сучасних досліджень стосовно бактеріоцинів направлені не тільки на вивчення їх структури і властивостей, а в першу чергу на інтенсифікацію їх синтезу. Стимуляція синтезу бактеріоцинів вперше була описана в 1989р. Дослідники в роботі [9] показали, що синтез бактеріоцину рейтерину, продуцент *L. reuteri* 1063, стимулювався за прямої взаємодії продуцента з бактеріями різних груп (*E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* та інші). Індукція синтезу рейтерину за присутності *E.coli* спостерігалась починаючи зі співвідношення *E.coli*/ *L. reuteri* 0,5/1,0, ефективність зростала зі збільшенням концентрації культури-індуктора. Всього в якості індукторів в даній роботі описано 82 штама, з них 41 штама виявився ефективним.

Метою даного літогляду є аналіз та узагальнення сучасних літературних даних щодо індукції синтезу бактеріоцинів, які можна розділити на три основні групи: фізичні (температура, тиск), хімічні (внесення в середовище культивування хім.речовин) та біологічні (використання мікроорганізмів у якості індукторів).

### **1.1. Мікроорганізми як біологічні індуктори**

Оскільки бактеріоцини використовуються як антимікробні агенти, дослідники в роботі [9] припустили, що внесення в середовище культивування мікроорганізмів, проти яких діє бактеріоцин, буде стимулювати збільшення його синтезу і посилення його антимікробної активності.

У 2011 році науковці висвітлили статтю [10], де показане дослідження впливу внесення в середовище культивування продуцента антимікробних пептидів *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 термічно інактивованих клітин *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 *B. cereus* ATCC 9634 та *Escherichia coli* ATCC 25922 (клітини автоклали при 121°C протягом 30 хв). Після отриманих результатів антимікробної активності бактеріоцинів, синтезованих з індукторами, проти штаму *L. monocytogenes* ATCC найефективнішим виявився *E. coli* ATCC 25922. Після виявлення ефективного індуктора дослідники почали варіювати стан його внесення. Під час культивування *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 додавали супернатант і живі

клітини *E. coli* ATCC 25922, далі досліджували вплив спільного культивування продуцента та індуктора, результати показані в *табл.1.1.* антимікробну активність перевіряли дискодифузійним методом, як контроль

використовували *E. coli* ATCC 25922 та *B. amyloliquefaciens* LBM 5006. Для експериментів у якості антимікробного агенту використовували супернатант.

Проте індуктором синтезу бактеріоцинів можуть бути не тільки бактерії. В роботі [11] досліджували вплив внесення дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на синтез лактобацилюстрину трьома штамми молочно-кислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595, R0011 та RW-9595M). І хоча дослідники не визначали антимікробну активність лактобацилюстрину, експеримент показав, що внесення дріжджів стимулювало збільшення синтезованого бактеріоцину майже на 50% (табл.1).

Ще одним ефективним продуцентом бактеріоцинів є *E. coli*, яка продукує коліцин. В статті [12] описаний експеримент зі спільним культивуванням двох штамів *E. coli* E7 та *E. coli* E2, продуцентів коліцину E7 та коліцину E2 відповідно. Дослідження показали, що *E. coli* E2 пригнічував ріст *E. coli* E7, отже можна зробити висновок, що в даному випадку *E. coli* E7 виступає індуктором синтезу коліцину E2.

Внесення живих та інактивованих клітин-індукторів для підвищення синтезу та антимікробної активності зацікавив і дослідників плантарицину [13]. В своїй роботі вони описують внесення в середовище культивування *Lactobacillus plantarum* J23 клітин *L.lactis* MG1363, *L.hilgardii* J81 та *P. pentosaceus* FVB63 в живому, інактивованому при 121 °С, 100 °С і 55°С стані, а також супертананти клітин. Антимікробну активність перевіряли на *Pediococcus pentosaceus* FVB63. Посилення інгібування росту тест-культури спричинили зразки плантарицину, синтезованого за присутності живих і термічно оброблених (55°С протягом 1 год) клітин всіх індукторів. Затримку росту також спричинив плантарицин, синтезований за присутності інактивованих клітин *L.lactis* MG1363 (100 °С протягом 15 хв). Клітини індукторів, які автоклаували 20 хв і супернатант ніяк не вплинули на активність синтезованого бактеріоцину.

Для дослідження впливу внесення у якості індукторів мікроорганізмів, дослідники в роботі [14] вносили в середовище культивування *Leuconostoc citreum* GJ7 різні види інактивованих клітин *Leuconostoc* та *Lactobacillus*. Для дослідження антимікробної активності синтезованих бактеріоцинів використовували супернатант, яким обробляли *L. plantarum* KFRI 464. Найвищу активність (виражали в умовних одиницях) показав бактеріоцин, синтезований за присутності *L. plantarum* KFRI 464. За результатами даного дослідження можна стверджувати, що найефективнішим індуктором посилення антимікробної активності виступає мікроорганізм, проти якого буде направлена його антимікробна дія.

Лістероз – одна з небезпечних хвороб людини і тварини, що передається через їжу на воду, спричиняється бактеріями роду *Listeria*. Потрапляючи в організм бактерія колонізує кишечник, перетинає кишковий бар'єр і надходить у кровообіг, завдяки чому може потрапляти в печінку, селезінку, мозок та плаценту. В роботі [15] перевіряли, чи дійсно внесення у якості індуктора мікроорганізм, на який направлена дія бактеріоцину, підвищує його активність. Відомо, що *L. plantarum* ATCC13643, продуцент лістеріолізину S є ефективним агентом у боротьбі з бактеріями (спричинює лізис клітини) Вплив на активність бактеріоцину перевіряли за допомогою спільного культивування продуцента лістеріолізину S з представником родини збудника лістерозину *L.monocytogenes*, проте дослідження показали, що *L.monocytogenes* не тільки не індукує збільшення синтезу лістеріолізину S, а і знижує його антибактеріальну активність, що було доведено на тій самій культурі *L.monocytogenes*.

Таблиця 1.1.

**Вплив внесення в середовище культивування клітин індукторів на синтез та антимікробну активність бактеріоцинів**

Бактеріоцин та його продуцент	Індуктор	Особливості проведення експерименту	Тест-культури	Результат індукції	Л-ра
<b>Антимікробні пептиди</b> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LBM 5006	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 термічно інактивований	Антимікробну активність визначали методом дифузії агарових дисків	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Активність (3500 AU/ml) – не змінилась порівняно з контролем	[10]
	<i>Listeria monocytogenes</i> термічно інактивований			Активність – не змінилась порівняно з контролем	
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634 термічно інактивований			Активність – не змінилась порівняно з контролем	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 термічно інактивований			Активність зросла до 13000 AU/ml	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 живі клітини			Активність – 6000 AU/ml	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 супернатант			Активність – не змінилась (3500 AU/ml)	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 кокультивування			Активність - 6000 AU/ml	
<b>Лактобацилюстри</b> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (ATCC)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011 + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Н.В	Виробництво збільшилось на 39% (99 мг / л) – на 48 год	[11]
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			Збільшилось на 49% (224 мг/л) на 48 год	

9595, R0011 та RW-9595M	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			Збільшилось на 42% (568 мг/мл) на 48 год	
<b>Коліцин E2</b> <i>Escherichia coli</i> E2	<i>Escherichia coli</i> E7	Кокультивування двох штамів у колбах на качалках за температури 37 °С на середовищі LB	Н.В	Продуцент E2 пригнічував ріст штаму E7, концентрація клітин штаму E2 на 24 год культивування – 10 <sup>11</sup> КУО/мл	[12]
<b>Плантарицин</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> J23	живі, атенуйовані при 121 °С, атенуйованих при 100 °С 15 хв, 55°С протягом 1 год, супернатант клітин <i>L.lactis</i> MG1363, <i>L.hilgardii</i> J81, <i>P. pentosaceus</i> FBB63	Інгібування росту тест-культури визначали на планшетах за оптичною густиною при OD <sub>600</sub>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB63	Ефективними виявились живі клітини всіх індукторів, атенуйовані при 100 °С хв клітини <i>L.lactis</i> MG1363 та всі клітини індукторів, оброблені при 55°С протягом 1 год	[13]
<b>Кімчицин</b> <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7	1) <i>Leuc. citreum</i> GJ7 + <i>L. plantarum</i> KFRI 464 2) <i>Leuc. citreum</i> GJ7 + <i>L. delbrueckii</i> KFRI 347 3) <i>Leuc. citreum</i> GJ7 + <i>L. acidophilus</i> KFRI 150 4) <i>Leuc. citreum</i> GJ7 + <i>L. mesenteroides</i> KCTC 1628 5) <i>Leuc. citreum</i> GJ7 + <i>Lact. plantarum</i> KFRI 236 6) <i>Leuc. citreum</i> GJ7 + <i>Leuc. mesenteroides</i> KFRI 218	В якості антимікробних агентів використовували супернатант	<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 464	Контроль без індуктора – 1600 AU\mL <sup>-1</sup> 1)– 6400 AU\mL <sup>-1</sup> 2),4)- 4000 AU\mL <sup>-1</sup>	[14]
<b>Лістеріолізін S</b> <i>L. plantarum</i> ATCC13643	<i>L.monocytogenes</i>	Перевіряли здатність інгібувати ріст <i>L.monocytogenes</i> за умов кокультивування	<i>L.monocyto- genes</i>	Кокультивування знижує антимікробну здатність	[15]

## 1.2. Хімічні речовини – індуктори синтезу та активності бактеріоцинів

У якості індукторів для синтезу бактеріоцинів можна використовувати хімічні речовини різної природи, а також варіювати кількісне внесення складових поживного середовища.

В статті [16] досліджують вплив желатину і ПАР на антимікробну активність бактеріоцинів *Lactobacillus plantarum* SC01. Зміну активності перевіряли на *E. coli*, *Salmonella*, *S. Aureus*, *B. Subtilis* та *L. monocytogenes*. До супернатанту додавали суміш желатин+альгінат у різній концентрації (від 1 до 4 %об.). Найефективнішим виявився зразок з додаванням 4%об. суміші желатин+альгінат, ступінь інгібування росту для всіх тест-культур становив 55-63 %, тоді як при внесенні 1%об суміші ступінь інгібування не перевищив 22%. Для визначення впливу ПАР використовували Tween 80, Tween 20, EDTA, сечовину та SDS. Серед поверхнево-активних речовин найкращий результат показав EDTA, який збільшив ступінь інгібування тест-культур на 10-30% порівняно з контролем (62-83%). Всі інші варіанти ПАР знижували активність бактеріоцину.

Для підвищення антимікробної активності аміловоріну L471, синтезованого *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 науковці використовували зміну концентрації глюкози, етанолу, а також варіювали склад поживного середовища. Початкова концентрація глюкози становила 5 г/л<sup>-1</sup>, яку поступово збільшували до 60 г/л<sup>-1</sup>. Позитивний вплив на активність бактеріоцину проти *L. delbrueckii subsp. bulgariczs* LMG 6901T дали концентрації 20,40 і 60 60 г/л<sup>-1</sup>. Антимікробну активність визначали методом критичного розведення і визначали в одиницях активності на мл<sup>-1</sup>. При додаванні етанолу в концентраціях від 10 до 30 мл/л<sup>-1</sup>, в середовище культивування, у двох випадках спостерігали інгібування росту продуцента, проте за кінцевої концентрації етанолу 10 мл/л<sup>-1</sup> відбувалось підвищення активності бактеріоцину в 2 рази. Для визначення найкращого поживного середовища, продуцент вирощували на рідких TGS, MRS та LHG, змінюючи

відсоток внесення джерела вуглецю та азоту. Найвищою була активність бактеріоцину, синтезованого на рідкому середовищі MRS з 4,0% глюкози та 8,8% азоту [17].

В роботі [18] досліджували вплив екзогенних факторів на підвищення активності бактеріоцину Lac-B23, який синтезується *Lactobacillus paracasei* J23. Спочатку перевіряли вплив складу поживного середовища (табл.2), з п'яти варіантів лише середовище №1 із вмістом пептону та м'ясного бульйону вплинуло на підвищення активності. Також в даному експерименті було доведено, що збільшення біомаси (при рості на середовищі 2) не впливає на збільшення антибактеріальних властивостей Lac-B23.

Таблиця 1.2

**Вплив складу поживного середовища на антибактеріальну активність *Lactobacillus paracasei* J23 [18]**

Компонент , г/л	Середовище №1	Середовище №2	Середовище №3	Середовище №4	Середовище №5
Пептон	10	-	-	-	-
Яловичий екстракт	10	-	-	-	-
Дріжджовий екстракт	5	5	-	-	-
Глюкоза	20	20	20	20	20
Цитрат амонію	2	2	-	-	1
MnSO4	0.25	0.25	0.25	-	0.25
MgSO4	0.58	0.58	0.58	-	0.58
КН2РО4	2	2	2	-	1
Активність (од/мл)	960	160	80	0	160

Далі перевіряли вплив внесення у середовище культивування амінокислот. У якості індукторів було обрано глютамінову кислоту, гліцин, тирозин, аланін та цистеїн. Порівняно з контролем (160 од/мл) ефективним виявилось внесення гліцину - 400 од/мл та цистеїну – 540 од/мл. Внесення інших амінокислот не вплинуло на активність бактеріоцину.

Внесення гліцерину у середовище культивування *Lactobacillus paracasei* J23 підвищило активність бактеріоцину до 970 од/мл (концентрація

гліцерину 1%), і хоча теоретично гліцерин може використовуватись як джерело вуглецю (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), кількість біомаси не змінилась порівняно з контролем, тому можна стверджувати, що гліцерин, в даному випадку, виступає як індуктор синтезу Lac-B23.

На здатність посилювати антибактеріальну здатність в роботі [18] також перевіряли піровиноградну куслоту, яка виявила аналогічний гліцерину ефект в концентрації 30г/л. Тут можна стверджувати, що ПВК виступає в ролі попередника синтезу амінокислот ( а як зазначалось вище, бактеріоцини – речовини білкової природи), проте дослідники припускають, що позитивний ефект викликаний зниженням рН середовища культивування (ПВК попередник синтезу молочної кислоти). Тим не менш активність бактеріоцинів синтезованих із внесенням ПВК становила 980 од/мл.

Підвищення антимікробної активності бактеріоцинів *Lactobacillus paracasei* CMGB16 в роботі [19] досягли обробкою супернатанту сульфатом аміаку в концентраціях 10-60% . Найвищу активність щодо тест-культури *E. Coli* (зона інгібування росту близько 1,3 см) проявив супернатант, оброблений 40%-им розчином, що на 30% більше порівняно з контролем без обробки сульфатом аміаку.

В статті [20] описаний вплив казеїну та лецитину на антимікробну активність продуцентів трьох бактеріоцинів: *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w – праказецин, *Enterococcus faecium* A5 – ентероцин, *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m – рамнозицин. Зміну активності перевіряли диско-дифузійним методом на пасивних тест-культурах *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Listeria innocua* CIP 80.11, *Escherichia coli* ATCC 23355, *Enterococcus faecalis* ATCC 1.144. встановлено, що внесення лецитину в концентраціях 0,1; 0,5; та 1,0 % знижує активність всіх трьох бактеріоцинів на 50-76%, а додавання казеїну в середовище культивування в концентраціях 1г/л, 5г/л і 10 г/л знижує активність бактеріоцинів в середньому на 60%.

Оскільки бактеріальні клітини виступають індукторами синтезу бактеріоцинів, в роботі [21] науковці перевірили здатність окремих

метаболітів мікробних клітин впливати на активність бактеріоцинів. Для роботи було обрано штам *Lactobacillus acidophilus* Д№75 як продуцента бактеріоцинів, та *E. coli* O75, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 на яких перевіряли антагоністичну активність диско-дифузійним методом. У якості індукторів використовували 2 препарати:

- 1) Aktoflor, Актофлор®-С г/100 мл : метіонін – 0,34; формиат натрію – 1,55; янтарна кислота – 1,62; натрію ацетат – 11,61; вода очищена – до 100 мл – комплекс метаболітів пробіотичних бактерій
- 2) Patogen, г/100 мл: аланін – 0,17; серин – 0,21; метіонін – 0,28; цистеїн – 0,23; гліцин – 0,15; натрію ацетат – 7,70; натрію формиат – 0,51; натрію лактат – 1,68; вода очищена – до 100 мл – комплекс метаболітів патогенних бактерій.

Експериментальні дані свідчать про те, що Aktoflor виявився ефективним індуктором синтезу бактеріоцинів. Зона затримки росту *S. aureus* та *E. coli* на 4-й день вирощування культур становила більше 38 см<sup>2</sup>, гірше бактеріоцини подіяли на *P. aeruginosa*, зона затримки якого на 4-й день вирощування становила 4,52 см<sup>2</sup>. Визначивши індекс стимуляції антимікробної активності встановили, що він залежить від концентрації внесеного препарату. Для будь якої тест-культури при внесенні 2,0 мг/мл Aktoflor індекс стимуляції становить в межах 3,97-6,46. При внесенні Patogen в тій самій концентрації індекс коливався в межах від 1,19 до 2,41 для всіх тест-культур. Аналізуючи свої попередні експериментальні дані, дослідники зробили висновок, що внесення препарати Aktoflor і Patogen підвищують антагоністичну активність штаму Д№75 до тест-культур у 2-5 разів.

В статтях [22-23] описано вплив налідиксової кислоти на синтез піоцинів S-типу бактеріями роду *Pseudomonas*. Для першого дослідження у 2013 році було обрано *P. aeruginosa* УКМ В-333, антибактеріальну активність якого перевіряли на *P. aeruginosa* УКМ В-3, УКМ В-10. Також в даний роботі визначали найбільш вдалий для підвищення активності бактеріоцинів поживне середовище. Встановили, що найкращим є поживне

середовище LB, а найкраща концентрація налідиксової кислоти становить 100мкг/мл при внесення в експоненційну фазу росту продуцента [23].

У 2017 році цими ж дослідниками було обрано 11 штамів *Pseudomonas aeruginosa* (УКМ В-1, УКМ В-6, УКМ В-7, УКМ В-9, УКМ В-13, УКМ В-330, УКМ В-332, УКМ В-333, УКМ В-335, УКМ В-349, УКМ В-353), антибактеріальну активність яких перевіряли проти фітопатогенних штамів *Pseudomonas*: *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026, *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В-1013 і IMB 9290, *P. aeruginosa* УКМ В-3 і УКМ В-10, *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039 методом двошарового агару, в якості антибактеріальних агентів використовували лізати клітин-продуцентів (результати див. табл.2) [22].

Для посилення антимікробної активності бактеріоцинів *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, автори статті [24] використовували зміну концентрації глюкози, а також вносили в середовище культивування поверхнево-активні речовини: твін 20, твін 80 та солі: цитрату натрію, калій хлориду і цистеїн. Перевірка активності бактеріоцинів на *L monocytogenes* Scott A показала, що зміна концентрації солей в поживному середовищі не впливає на антимікробну активність. Проте, внесення ПАР, цистеїну та глюкози об'ємом 10 мг/мл<sup>-1</sup> дали позитивний ефект і підвищили антибактеріальну дію бактеріоцинів в середньому у 1,5-2 рази.

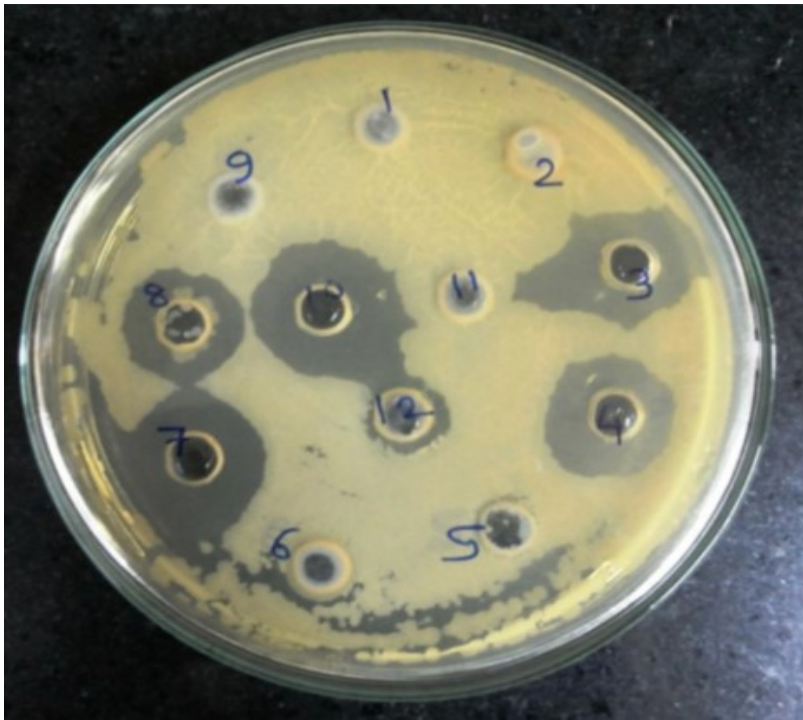
В роботі [25] автори повідомляють, що оптимізація поживного середовища підвищує антимікробну активність бактеріоцинів *L. plantarum* YJG проти тест-культури *S. aureus* IVDC C56005. Дослідники змінювали концентрацію солей (табл.3), джерело вуглецю та азоту.

Найкращою концентрацією солей було обрано варіант №1, як джерело вуглецю серед глюкози меляси та кукурудзяної муки дослідники обрали глюкозу. Досліджуючи вплив дріжджового екстракту, сечовини, соєвого пептону та білкового порошку, антибактеріальна активність зросла при рості на дріжджовому екстракті.

Концентрація солей в середовищі культивування *L. plantarum* YJG

Варіант	CaCO <sub>3</sub> (г/л)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (г/л)	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (г/л)
1	5	1,0	1,0
2	5	2,0	1,5
3	5	3,0	2,0
4	10	1,0	1,0
5	10	2,0	1,5
6	10	3,0	2,0
7	15	1,0	1,0
8	15	2,0	1,5
9	15	3,0	2,0

Із живих видів молюсків в лабораторних умовах науковці відбирали та висівали бактерії роду *Vibrio*. Для експериментів, описаних в роботі [26], було відібрано 40 ізолятів, які перевіряли на антибактеріальну активність за рахунок синтезу бактеріоцинів. Антимікробну активність перевіряли методом агарових блоків на культурі *S. aureus*. Після отримання та обробки даних дослідники виділили штам (ізолят №8), який проявляв найвищу антимікробну активність, і досліджували вплив ПАР на антимікробні властивості бактеріоцинів. В якості хімічних індукторів використовували сечовину та додецилсульфат натрію (SDS). Встановили, що двогодинна обробка бактеріоцинів різними концентраціями SDS значно підвищує їх антимікробну активність проти тест-культури. На рис.1 можна побачити зони затримки росту *S. aureus* під дією оброблених SDS бактеріоцинів. Позначені на чашці Петрі зони 3, 7 і 10 – результат обробки ПАР в концентраціях 0,25; 0,5; 1,0%об. відповідно.



**Рис.1** Вплив ПАР на антибактеріальну активність бактериоцинів бактерій роду *Vibrio*

Таблиця 1. 4

## Вплив внесення хімічного індуктора на антимікробну активність бактеріоцинів

Бактеріоцин та його продуцент	Індуктор/фаза росту продуцента (якщо є)	Особливості проведення експерименту	Тест-культури	Результат індукції	Л-ра
<i>Lactobacillus plantarum</i> SC01	желатин+альгінат, рН,	Антимікробну активність визначали субкультивуванням. Ступінь інгібування встановлювали за оптичною щільністю ( 600 нм (OD600))	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>S. Aureus</i> , <i>B. Subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Майже у всіх випадках ступінь інгібування був більше 50% для всіх тест-культур	[16]
<b>Аміловорін L471</b> <i>Lactobacillus amylovorus</i> DCE 471	Концентрація глюкози, етанолу, склад середовища	Активність визначали методом критичного розведення	<i>L. delbrueckii subsp. bulgariczs</i> LMG 6901T	Глюкоза 20, 40,60 г/л <sup>-1</sup> – активність 6400 AU ml <sup>-1</sup> Кінцева концентрація етанолу 10мл/л <sup>-1</sup> – збільшення активності у 2 рази (800AUml <sup>-1</sup> МРС бульйон (4% глюкози, 8,8% азоту) - 11200 AU ml <sup>-1</sup>	[17]
<i>Lactobacillus paracasei</i> CMGB16	сульфат аміаку	В якості антимікробного агенту використовували супернатант. Активність перевіряли методом дифузії в агар	<i>E. coli</i> 2	При застосуванні пребіотику активність збільшується у присутності лактулози та рафінози резистентний до трипсину, папаїну та ліпази і інгібується присутністю протеїнази К та пепсину. Найефективніша концентрація сульфату аміаку – 40% (зона	[19]

				затримки росту 120мм)	
<b>Бактеріоцин Лас-В23</b> <i>Lactobacillus paracasei</i> J23	амінокислоти Гліцерин ПВК Склад середовища		Н.В	Гліцин і цистеїн стимулюють синтез і збільшують активність Підвищення активності шляхом зниження рН (5,5) Позитивний вплив залежно від дози та часу	[18]
<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>spp. paracasei</i> BN ATS 8w – <b>праказецин</b> , <i>Enterococcus faecium</i> A5 – <b>ентероцин</b> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> FAZ 16m – <b>рамнозицин</b>	Лецитин Казеїн	антимікробну активність, активність перевіряли методом дифузії в агар	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340, <i>Listeria innocua</i> CIP 80.11, <i>Escherichia coli</i> ATCC 23355, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1.144	будь-яка концентрація препарату лецитину (0,1; 0,5; 1,0;%) знижує активність всіх трьох бактеріоцинів на 50-76% проти даних тест-культур, Казеїн в концентрації 1г/л, 5г/л і 10 г/л знижує активність бактеріоцинів на 60%	[20]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Д№75	Актофлор Патоген	Визначали вплив комплексу пробіотичних і патогенних метаболітів на антагоністичну активність. АА визначали дифузійним методом та за допомогою рідких середовищ	<i>Escherichia coli</i> O75, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Найвищий індекс стимуляції за допомогою Актофлор спостерігався за концентрації 0,25 мг/мл (підвищення АА в середньому в 4-6 разів) Патоген показав кращі результати в концентрації 0,5 мг/мл (проте АА збільшилась лише у 2,4 рази)	[21]

<p><b>Піоцини S-типу</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11 штамів: УКМ В-1, УКМ В-6, УКМ В-7, УКМ В-9, УКМ В-13, УКМ В-330, УКМ В-332, УКМ В-333, УКМ В-335, УКМ В-349, УКМ В-353)</p>	<p>Вплив налідиксової кислоти (до кінцевої концентрації 100 мкг/мл),</p>	<p>Антимікробну активність визначали методом двошарового агару</p>	<p><i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> УКМ В-1026, <i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154, <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027, <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1013 і ІМВ 9290, <i>P. aeruginosa</i> УКМ В-3 і УКМ В-10, <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> УКМ В-1039.</p>	<p>Показано, що введення налідиксової кислоти в експоненційну фазу підвищує активність лізатів штамів РАЕ-8, 19, 21, 22, 24, 41 проти тест-культур УКМ В-1027, 1039, 1154, 1013, 1026, ІМВ – 9290. Найефективнішим виявився штам РАЕ-22, зони затримки росту становили від 9 до 21 мм.</p>	<p>[22]</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> УКМ В-333</p>	<p>Вплив налідиксової кислоти і складу середовища культивування.</p>	<p>Антимікробну активність визначали методом двошарового агару</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> УКМ В-3, УКМ В-10</p>	<p>За кінцевої концентрації налідиксової кислоти 100 мкг/мл: проти штаму УКМ В-3 – 450x10*3 ОА/мл, проти штаму УКМ В-10 – 870x10*3 ОА/мл. При культивуванні продуцента в середовищі LB: проти штаму УКМ В-3 – 500x10*3 ОА/мл, проти штаму УКМ В-10 – 7000x10*3 ОА/мл</p>	<p>[23]</p>
<p><i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a</p>	<p>Вплив внесення глюкози, твін 20, твін 80, цитрату натрію, калій хлориду і цистеїну в</p>		<p><i>L monocytogenes</i> <i>Scott A</i></p>	<p>Глюкоза (10 mg mL<sup>-1</sup>) – активність 8800 AU/mL<sup>-1</sup> Твін 20 (10 μL mL<sup>-1</sup>) - активність 8800 AU/mL<sup>-1</sup> Твін 80 (10 μL mL<sup>-1</sup>) -</p>	<p>[24]</p>

	середовище культивувануя			активність 5600 AU\mL <sup>-1</sup> Цитрат натрію (0,3 і 1,0 mg mL <sup>-1</sup> ) – зміна концентрації не вплинула на активність 2600 AU\mL <sup>-1</sup> Калій хлорид (0,55 і 3,0 mg mL <sup>-1</sup> ) - зміна концентрації не вплинула на активність 2600 AU\mL <sup>-1</sup> Цистеїн (0,25 і 0,5 mg mL <sup>-1</sup> ) – активність 5600 AU\mL <sup>-1</sup>	
<i>L. plantarum</i> YJG	Вплив джерела вуглецю та азоту, а також концентрації солей		<i>S. aureus</i> IVDC C56005	Джерело вуглецю – глюкоза – інгібування росту до 120 мм Джерело азоту – дріжджовий екстракт – інгібування до 220 мм Концентрація солей (г/л): CaCO <sub>3</sub> – 5,0; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,0; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,0	[25]
<b>Віброцин</b> Бактерії роду <i>Vibrio</i> (ізолят №8)	ПАР (Додецилсульфат натрію (SDS), сечовина)	Антимікробну активність перевіряли методом агарових блоків	<i>S. aureus</i>	SDS підвищує активність	[26]

### **1.3. Вплив рН на антимікробну активність бактеріоцинів**

Кислотність середовища (рН) є одним з важливих факторів, що визначає розвиток бактерій, впливає на розчинність речовин живильного субстрату й надходження їх до клітини. Зміна реакції середовища нерідко супроводжується підвищенням концентрації токсичних сполук. Слід зазначити, що хоча мікроорганізми й можуть здійснювати процеси життєдіяльності в умовах різної кислотності або лужності середовища, реакція усередині клітин підтримується завжди близькою до нейтральної. Це досягається завдяки наявності в цитоплазмі буферних систем і низької напівпроникності мембрани для іонів водню [26].

Саме тому дослідники бактеріоцинів не рідко перевіряють вплив рН середовища культивування на синтез та підвищення активності бактеріоцинів, а також піддають синтезовані бактеріоцини обробці речовин, що змінюють рН.

В табл. 5 наведені результати, що свідчать про те, що не завжди зміна рН середовища позитивно впливає на протимікробні властивості бактеріоцинів, іноді занадто високі або низькі значення рН не впливають на антимікробну активність [19,26], а інколи навіть інактивують бактеріоцини [19].

Таблиця 1.5

## Вплив зміни рН на антимікробну активність бактеріоцинів

Бактеріоцин та його продуцент	Значення рН	Особливості проведення експерименту	Тест-культури	Результат індукції	Л-ра
<i>Lactobacillus plantarum</i> SC01		Антимікробну активність визначали субкультивуванням. Ступінь інгібування встановлювали за оптичною щільністю ( 600 нм (OD600))	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>S. Aureus</i> , <i>B. Subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Майже у всіх випадках ступінь інгібування був більше 50% для всіх тест-культур	[16]
<i>Lactobacillus paracasei</i> CMGB16	рН 2,0-9,0	В якості антимікробного агента використовували супернатант. Активність перевіряли методом дифузії в агар	<i>E. coli</i> 2	Активність не змінилась (при рН2,0 та 9,0 неактивний)	[19]
<i>Bacillus endopheticus</i> u <i>Bacillus licheniformis</i>	рН 7,0		<i>E. coli</i> 1753	<i>B. endopheticus</i> - 12 мм <i>B. licheniformis</i> - 13 мм	[27]
<i>E. faecium</i> J1-48	рН 6,0	інтенсивність синтезу визначали за допомогою бактеріального титру і антимікробну активність перевіряли методом дифузії в агар	<i>L. bulgaricus</i> 340	бактеріальний титр 3800ПЕ/мл	[28]
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a	рН 5,5 і 5,0		<i>L. monocytogenes</i> Scott A	активність 6400 AU\mL <sup>-1</sup>	[24]
<b>Віброцин</b> Бактерії роду <i>Vibrio</i> (ізолят №8)	рН 4,0-8,5	Антимікробну активність перевіряли методом агарових блоків	<i>S. aureus</i>	Активність не змінилась	[26]

#### 1.4. Вплив температури культивування на антимікробну активність бактеріоцинів

Життєдіяльність прокаріот безпосередньо залежить від температурного діапазону. Він характеризується трьома кардинальними точками: мінімальна температура, нижче якої припиняється ріст і розвиток бактерій; оптимальна температура, відповідає найвищій швидкості росту мікроба, максимальна температура, вище якої швидкість росту бактерій практично знижується до нуля. Розрізняють три основні температурні зони, що мають визначальне значення для розвитку бактерій: мінімум, оптимум і максимум. Ці температурні точки, хоча і є характерними для кожного виду мікробів, але вони можуть змінюватися під впливом інших факторів зовнішнього середовища [28].

Зважаючи на те, що температура культивування безпосередньо впливає на ріст і розвиток продуцента, в сучасній літературі зустрічається всі більше інформації про дослідження впливу температури на синтез та протимікробну дію бактеріоцинів.

В роботі [30] показано, що з підвищенням температури до 37°C культивування зростає кількість бактеріоцину, синтезованого *Bacillus safensis* ВКПМ В-12180 і *Bacillus pumilus* ВКПМ В-12182, а в статті [29] дослідники стверджують, що, навпаки, зниження температури з 37 до 25°C позитивно впливає на активність сакацину А, синтезованого *Lactobacillus sakei* Lb706 проти *L. sakei* Lb790. Інші дослідження з табл.6 наведено дослідження, які показують, що зміна температури культивування спричиняє позитивний ефект на підвищення антимікробної дії бактеріоцинів.

Таблиця 1.6

## Вплив температури культивування на антибактеріальну дію бактеріоцинів

Бактеріоцин та його продуцент	Значення температури	Особливості проведення експерименту	Тест-культури	Результат індукції	Л-ра
Сакацин А <i>Lactobacillus sakei</i> Lb706	25-30 °С  34 ± 5 °С	За підвищення температури культивування спостерігалось зниження активності, проте при поверненні нормальної температури – відновлення антимікробної активності	<i>L. sakei</i> Lb790	250-500 BU/ml  Менше 80 BU/ml	[29]
<i>Bacillus safensis</i> ВКІІМ В-12180, <i>Bacillus pumilus</i> ВКІІМ В-12182	25±2 °С 30±2 °С 37±2 °С	Визначали вплив температури на інтенсивність приросту біомаси	Н.В	25±2 °С – <i>B. safensis</i> ВКІІМ В-12180 – 3,448 мг/мл <i>B. pumilus</i> ВКІІМ В-12182 – 3,01 мг/мл 30±2 °С - <i>B. safensis</i> ВКІІМ В-12180 – 4,26 мг/мл <i>B. pumilus</i> ВКІІМ В-12182 – 3,78 мг/мл 37±2 °С - <i>B. safensis</i> ВКІІМ В-12180 – 3,19 мг/мл <i>B. pumilus</i> ВКІІМ В-12182 – 3,61 мг/мл	[30]
<i>Bacillus endopheticus</i> u <i>Bacillus licheniformis</i>	20-60 °С 20-70 °С	Активність перевіряли диско-дифузійним методом з подальшим визначенням зон інгібування тест-культури в мм	<i>E. coli</i> 1753	<i>B. endopheticus</i> -12 мм <i>B. licheniformis</i> - 13 мм	[27]
<i>E. faecium</i> J1-48	37±2 °С	інтенсивність синтезу визначали за допомогою бактеріального титру і антимікробну активність перевіряли методом дифузії в агар	<i>L. bulgaricus</i> 340	бактеріальній титр 3800 ПЕ/мл	[28]

<i>Lactobacillus pentosus</i> М3	30°C	активність визначали методом дифузії в агар	<i>L. bulgaricus</i> 340	бактеріальний титр 240 ПЕ/мл (в кінці експоненційної фази)	[31]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> УКМ В-333	28°C	Антимікробну активність визначали методом двошарового агару	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> УКМ В-3, УКМ В-10	За температури 28 °С: проти штаму УКМ В-3 – 125x10*3 ОА/мл, проти штаму УКМ В-10 – 250x10*3 ОА/мл	[23]
<i>Lactobacillus sakei</i> <i>subsp. sakei</i> 2a	25°C ,30°C, 40°C		<i>L. monocytogenes</i> <i>Scott A</i>	За температури 25°C і 30°C – активність 3200 AU\mL <sup>-1</sup>	[24]

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### 2.1.Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження були поверхнево-активні речовини гліколіпідної природи, синтезовані *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405. *N. vaccinii* К-8 – штам, що виділений із забруднених нафтою зразків ґрунту. Штам зареєстровано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7405 [3].

За хімічною структурою ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 – комплекс ліпідів різної природи. При рості продуцента на гліцеролі ПАР складаються з гліколіпідів (трегалозодимікодати і трегалозодіацелати), нейтральних ліпідів, серед яких виявлені *n*-алканові та міколові кислоти та аміноліпідів [3].

Як тест-культури для визначення властивостей досліджуваних ПАР було обрано бактеріальні (*Escherichia coli* ІЕМ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Bacillus subtilis* БТ-2) та дріжджові (*Candida utilis* БВС-65, *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2) клітини. Тест-культури взяті з колекції живих мікробних культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

У якості індукторів синтезу та активності ПАР використовували дріжджі *Candida utilis* БВС-65 та *Candida tropicalis* РЕ-2, також з колекції живих мікробних культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

### 2.2.Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 і підготовка індукторів

*N. vaccinii* ІМВ В-7405 культивували в середовищі такого складу (г/л):

- $\text{NaNO}_3$  – 0,5;

					НУХТ БТЕК 04.01.01 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Царьова А.М.			ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					10	24
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- 
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$ ;
- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,1$ ;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1$ ;
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,01$ ,
- дріжджовий автолізат 0,5% (об'ємна частка)

Як джерело вуглецю використовували очищений гліцерин у концентрації 1% (об'ємна частка).

Посівний матеріал становив 10% від об'єму поживного середовища. В якості посівного матеріалу використовували культуру, вирощену на середовищі такого ж складу, прете з внесенням 0,5% об'ємної частки гліцерину.

*N. vaccinii* ІМВ В-7405 вирощували в колбах об'ємом 750 мл на качалках при 28-30°C, 320 об/хв протягом 5 діб.

Клітини індукторів *C. tropicalis* і *C. utilis* вирощували протягом 1 доби на скошеному агаризованому середовищі Сусло, вносили на початку (лаг-фаза) та в середині (експоненційна фаза) культивування. Також варіювали внесення живих та інактивованих клітин. Для порівняння результатів в контрольні колби індукторів не вносили.

Живі клітини індуктора вносили в об'ємі 2,5 мл в кожную посівну колбу (суспензію індукторів готували з розрахунком 2 косяка на 100 мл води).

Інактивовані клітини вносили в об'ємі 10 мл в кожную посівну колбу (суспензію індукторів готували з розрахунком 2 косяка на 100 мл води). Для інактивації клітин індуктора готову суспензію кип'ятили на водяній бані протягом 4 годин.

### **2.3. Виділення ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 з культуральної рідини, визначення концентрації та підготовка розчинів ПАР**

Відділення клітин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 від культуральної рідини здійснюють центрифугуванням впродовж 25 хв при 8000 об/хв.

Концентрацію ПАР визначають ваговим методом після екстракції їх з супернатанту сумішшю Фолча та випарювання на роторній установці за абсолютного тиску 0,5 атм до постійної маси.

Для екстракції ПАР у циліндричну ділительну воронку об'ємом 100 мл вносять 25 мл супернатанту і 25 мл суміші Фолча (хлороформ і метанол в співвідношенні 2:1), воронку закривають пришліфованою пробкою і струшують (для екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають в воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирають (органічний екстракт 1), а водну фазу піддають повторній екстракції, як описано вище. Після розділення фаз зливають нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додають 50 мл суміші Фолча, здійснюють екстракцію, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують і упарюють на роторнійвипарній установці при температурі 50°C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси [ 32]

Після випарювання поверхнево-активні речовини розчиняли у стерильній дистильованій воді об'ємом 25 мл. Готові розчини ПАР стерилізували в автоклаві при 112 °C впродовж 30 хв.

#### **2.4.Визначення антимікробної активності ПАР**

Антимікробну активність ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 із внесенням біологічних індукторів визначали методом МІК (мінімальна інгібуюча концентрація). Визначення МІК здійснювали за методикою, описаною в статі [33].

У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл поживного середовища (МПБ для бактеріальних та рідке Сусло для дріжджових тест-культур), у першу пробірку вносили 1 мл розчину ПАР певної (найвищої) концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку. Аналогічні операції проводили для наступних дев'яти пробірок. Таким чином концентрація ПАР у кожній наступній пробірці знижувалася у рівно вдвічі.

Для порівняння результатів в одну пробірку вносили лише поживне середовище, без додавання препарату ПАР (контроль).

Після розведень у кожен пробірку вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур ( $10^5$ – $10^6$  КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28–30 °С для бактерій та 24–26 °С для дріжджів. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища. Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як концентрацію ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній.

### **2.5.Визначення ступеня руйнування біоплівки**

Дослідження ступеню руйнування мікробних біоплівок здійснювали методом, описаним в роботі [34]

Дослід також проводили із використанням 96-лункових планшетів. Мікробну біоплівку утворювали протягом 2 діб шляхом внесення 180 рідкого поживного середовища та 20 мкл добової культури, вирощеної у відповідному рідкому середовищі. Далі планшети інкубували протягом 24 годин при 28–30 °С для бактерій та 24–26 °С для дріжджів. Наступного дня (через 24 год) культуральну рідину в стерильних умовах зливали і вносили свіже поживне середовище та 20 мкл суспензії клітин тест-культур. Планшети знову інкубували у термостатах 24 год за відповідних температур.

По закінченню другої доби культуральну рідину зливали, а в кожен лунку планшета, на стінках якого утворилась мікробна біоплівка, вносили препарати ПАР об'ємом 200 мкл. Попередньо в стерильних пробірках підготували двократні серійні розведення ПАР. Концентрація досліджуваних препаратів зменшувалась згори до низу, як і в попередньому досліді. Для контролю в 3 лунки замість препаратів ПАР вносили 200 мкл стерильної водопровідної води.

Планшети залишали на добу у термостатах, після чого кожен лунку 3 рази промивали стерильною дистильованою водою, після чого залишок адгезованих клітин фарбували метиленовим синім впродовж 15 хв, змивали

дистильованою водою залишок зруйнованих клітин тест-культури, а пофарбовані клітини, що залишились на стінках змивали 33-х% оцтовою кислотою.

Кількість адгезованих клітин визначали за допомогою фотоелектроколориметра при довжині хвилі 540 нм. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках планшету.

## **2.6.Визначення антиадгезивної активності ПАР**

Антиадгезивну активність визначали за допомогою методу, описаного в роботі [35]

Для роботи було обрано 3 поверхні – кахель, скло і метал. На початку експерименту кожну поверхню площею 1 см<sup>2</sup> ретельно мили за допомогою дез.засобу та ополіскували водою. По 1 поверхні поміщали в чашку Петрі та стерилізували протягом 30 хв при 121 °С. Після стерилізації досліджувані поверхні обробляли розчинами ПАР, для контролю декілька чашок з поверхнями обробляли дистильованою водою. Оброблені пластини поміщали в термостат на 24 год. По закінченню доби препарати ПАР зливали, а пластини омивали стерильною дистильованою водою

Суспензію тест-культури готували у 100 мл стерильної водопровідної води з розрахунку 1 добова культура, вирощена на скошеному агаризованому середовищі на 100 мл води.

В кожну чашку Петрі заливали 10 мл готової суспензії клітин і витримували в термостатах при відповідних температурах для кожної тест-культури. По закінченню експозиції суспензію зливали, поверхні омивали стерильною водою. Досліджувані поверхні залишали висихати на повітрі, після чого прикріплені клітини 15 хв фіксували метанолом (концентрація спирту – 99%). Для визначення адгезованих клітин поверхні фарбували 1%-им розчком генціанвіолету протягом 6 хв. Пофарбовані пластини змивали водопровідною водою, а фарбу, що лишилась на адгезованих клітинах

змивали 33%-им розчином оцтової кислоти. Залишок адгезованих клітин визначали на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 540 нм.

Кількість адгезованих клітин визначали як відношення оптичної густини суспензії, отриманої після оброблення матеріалів препаратами ПАР, до оптичної густини суспензії контролю (без обробки ПАР).

## РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *N. vaccinii* ІМВ В-7405, СИНТЕЗОВАНИХ В ПРИСУТНОСТІ ДРІЖДЖОВИХ ІНДУКТОРІВ

### 3.1. Вплив внесення біологічних індукторів на синтез ПАР

Аналізуючи літературні дані можна зробити висновок, що все більша кількість дослідження антимікробних речовин спрямована на посилення їх активності шляхом внесення в середовище культивування біологічних індукторів. Так, в роботі [36] автори досліджували вплив внесення в середовище культивування трьох штамів-продуцентів лактобацилюстрину *Lactobacillus rhamnosus* (АТСС 9595, R0011 та RW-9595М) дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Для всіх трьох штамів на 48-му годину культивування синтез бактерицину збільшився на 38-49%.

У роботі [37] автори повідомляють, що синтез таких антимікробних речовин як антибіотики індуються впливом на продуцент конкурентного мікроорганізму. Так відкриття антибіотику алхівеміцину А відбулось при дослідженні комбінованих культур (ко-культивування) 11 штамів продуцентів (серед яких *S. lividans* ТК23, та 10 штамів *S. coelicolor* А3, S501, S510, S522, S536, S558, S566, S573, S576, S589) з індуктором *Tsukamurella pulmonis*. Синтез антибіотика відбувався у 10 з 11 досліджуваних штамів (усі окрім *S. coelicolor* S501)

Після отримання результатів індукції властивостей ПАР за допомогою внесення у якості біологічних індукторів бактеріальних клітин [38], було зроблене припущення, що посилювати властивості синтезованих ПАР можуть і дріжджові клітини. У даному експерименті використовували дріжджі роду *Candida*.

На першому етапі метою було дослідити, чи впливають дріжджові індуктори на кількість синтезованого цільового продукту. Результати наведені в табл.3.1

					НУХТ БТЕК 04.01.01 ДР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Царьова А.М.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.				10	24
Реценз.	40				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
					РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПАР <i>N. vaccinii</i> ІМВ -7405, СИНТЕЗОВАНИХ В ПРИСУТНОСТІ ДРІЖДЖОВИХ ІНДУКТОРІВ		

**Концентрація поверхнево-активних речовин, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за внесення дріжджів роду *Candida* в середовище культивування**

Біологічний індуктор	Стан індуктора	Фаза внесення	Концентрація ПАР (г/л)
<i>Candida tropicalis</i> БВС-65	Живі клітини	Лаг-фаза	0,71
		Експоненційна фаза	0,64
	Інактивовані клітини	Експоненційна фаза	0,6
		Контроль (без внесення індуктора)	
<i>Candida utilis</i> РЕ-2	Живі клітини	Лаг-фаза	0,64
		Експоненційна фаза	0,4
	Інактивовані клітини	Лаг-фаза	0,72
		Експоненційна фаза	0,67

**Висновки:** Автори роботи [38], аналізуючи сучасну літературу зробили висновок, що у відповідь на присутність бактерій-індукторів у середовищі культивування продуцента ПАР підвищується не синтез цільового продукту (поверхнево-активних речовин), а посилюється їх антимікробна дія. Так вийшло і в даному дослідженні.

Не зважаючи на те, що внесення біологічного індуктора в середовище культивування зменшувало кількість синтезованого цільового продукту, в подальших експериментах ми довели, що це в декілька десятків разів посилює їх властивості, тому вважаємо доцільним використовувати *C. utilis* РЕ-2 і *C. tropicalis* БВС-65 у якості індукторів синтезу і активності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

### 3.2. Вплив внесення дріжджів роду *Candida* на антимікробну активність ПАР

Вперше антимікробна дія ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 була встановлена на фітопатогенні бактерій родів *Pseudomonas* і *Xanthomonas* [32]. В дослідженнях як антимікробні агенти використовували розчин супернатанту і

препарати ПАР з концентрацією 0,085-0,85 мг/мл. При обробленні препаратами впродовж 2 годин кількість фітопатогенних клітин знижувалась на 95-100% .

В роботі [39] дослідники перевіряли антимікробну дію ПАР *N. vaccinii* на тест-культурах бактерій і дріжджів за умов росту продуцента ПАР на відпрацьованій олії. МІК для дріжджів роду *Candida* становило 284 мкг/мл. Для *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 значення мінімальної інгібуючої концентрації лежить в межах від 22 до 142 мкг/мл.

Після виявлення і дослідження антимікробної дії ПАР науковці зацікавились способами регуляції даної властивості [38]. Для посилення антимікробної дії ПАР використовували бактерії *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2. В середовище культивування продуцента під час експоненційної та лаг-фази клітини-індуктори вносили в живому та інактивованому стані.

Як тест-культури для визначення МІК використовували ті ж самі мікроорганізми, які використовувались і якості індукторів. Визначення МІК показали, що внесення індуктора збільшувало антимікробну активність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405. МІК препарату без індукторів становила 80-120 мкг/мл. В той же час, використання препаратів ПАР, синтезованих на середовищі з індукторами = 6-80 мкг/мл для різних тест-культур.

Ці ж самі препарати перевіряли на інших штаммах мікроорганізмів. Для *Pseudomona ssp.* МІ-2 і *Proteus vulgaris* ПА-12 МІК коливається від 6 до 21 мкг/мл. При використанні препаратів, синтезованих на середовищах без внесення індукторів МІК для даних бактерій становила 80 мкг/мл.

Тих самих авторів зацікавило, чи впливає джерело вуглецю на антимікробну активність ПАР, тому *N. vaccinii* ІМВ В-7405 культивували у середовищі наведеного вище складу + індуктори *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 (тільки живі клітини), проте замість гліцерину вносили рафіновану соняшникову олію та олію після смаження картоплі фрі. За цих умов МІК щодо тест-культур знизилась на декілька порядків (0,5-3 проти *E. coli* ІЕМ-1,

0,7-6 проти *B. subtilis* БТ-2, 0,9-3 проти *Pseudomona ssp.* МІ-2, 3,5-14 проти *P. vulgaris* ПА-12 і 1,8-3 проти *S. aureus* БМС-1) [40]

Проте *N. vaccinii* не єдиний продуцент ПАР, що цікавить науковців. В доступній літературі можна знайти дані про інші продуценти ПАР, регуляція активності яких вивчається і до сьогодні. Так дослідники в роботі [41] з поверхонь зеленої мідії виділили 4 ізоляти, названі пізніше D1, S3, S8 та V1, які проявляли антимікробну активність. Пізніше встановили, що антимікробна активність отриманих ізолятів пов'язана з синтезом ПАР. Дослідники зацікавились, чи можна регулювати активність синтезованих ПАР. У якості індукторів було обрано 4 мікроорганізми: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilus*, *Candida albicans* і *Yarrowia lipolytica*. У якості тест-культур для перевірки антимікробної активності були використані самі індуктори (активність визначали методом дифузії паперових дисків в агар з подальшою оцінкою зон затримки росту). Найкращим виявився препарат ПАР ізоляту V1 із внесенням *P. aeruginosa* проти *B. pumilus*, *P. aeruginosa* та *C. Albicans* - зони затримки росту коливались від 15 до 24 мм, тоді як *Y. lipolytica* виявилась не тільки найсильнішою тест-культурою (майже всі препарати були неефективними проти неї), а і майже не посилювала активності синтезованих ПАР. Проте культивування ізолятів D1, S3, S8 із внесенням *P. aeruginosa* спричинювали затримку росту *Y. lipolytica* від 9 до 17 мм.

Дослідників також цікавить, чи впливає стан внесення індуктора на активність синтезованої антимікробної речовини. В роботі [42] для підвищення антимікробної активності «антимікробних пептидів» *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 ефективним виявилось внесення живих і термічно інактивованих клітин *Escherichia coli* ATCC 25922. Антимікробну активність перевіряли методом дифузії дисків в агар на тест-культурі *L. monocytogenes* ATCC 7644 і виражали в одиницях активності (AU/ml). Порівняно з контролем (3500 AU/ml), внесення інактивованого індуктора *E.*

*coli* ATCC 25922 підвищило активність антимікробних пептидів до 13000 AU/ml

В наших дослідженнях ми припустили, що внесення дріжджових індукторів може вплинути на активність синтезованих ПАР як проти дріжджових клітин, так і проти бактеріальних. Тому МІК визначали на різних тест-культурах. Результати дослідження наведені в табл.2.2 і табл.2.3

Таблиця 3.2

**Дослідження антимікробних властивостей ПАР, синтезованих штамом *N. vaccinii* IMB B-7405 проти бактеріальних клітин**

Варіант досліджу	МІК (мкг/мл)			
	<i>E. coli</i> IEM-1	<i>S. aureus</i> БМС-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні)
<i>Candida tropicalis</i> живі, лаг-фаза	100	25	100	<b>3,125</b>
<i>C. tropicalis</i> живі, експоненційна фаза	<b>1,5625</b>	50	12,5	6,25
<i>C.utilis</i> живі, експоненційна фаза	12,5	50	25	12,5
<i>C.utilis</i> , інактивовані, експоненційна фаза	12,5	100	<b>1,5625</b>	<b>1,5625</b>
<i>C.utilis</i> , живі, лаг-фаза	<b>3,123</b>	100	<b>3,125</b>	<b>0,78125</b>
<i>C.utilis</i> , інактивовані, лаг-фаза	<b>1,5625</b>	100	<b>1,5625</b>	<b>6,25</b>
<i>C. tropicalis</i> , інактивовані, експоненційна фаза	<b>1,5625</b>	100	<b>0,78125</b>	<b>1,5625</b>
Контроль (без внесення індукторів)	100	100	25	50

**Висновки:** не зважаючи на те, що найбільша кількість ПАР в умовах попереднього експерименту була синтезована без внесення в середовище культивування біологічного індуктора (1,46 г/л), в цьому експерименті ми довели, що використання як індукторів дріжджів роду *Candida* супроводжувалось синтезом ПАР, мінімальна інгібуюча концентрація яких

була в декілька разів нижчою по відношенню до всіх тест культур окрім *S. aureus* БМС-1. Отже внесенням біологічного індуктора в середовище культивування можна зменшити витрати дороговартісних ПАР, які являються ефективними антимікробними агентами.

Порівнюючи з експериментальними даними, отриманими в роботі [38], внесення дріжджів у якості індукторів є ефективнішим, ніж внесення бактеріальних клітин. В попередньому дослідженні найнижчу МІК проявили 2 препарата ПАР: 1) синтезований із внесенням живих клітин *E. coli* ІЕМ-1 в експоненційній фазі (15 проти *B. subtilis* БТ-2 (вегетативні клітини), 30 проти *B. subtilis* БТ-2 (спори) і 6 проти *E. coli* ІЕМ-1 ); 2) ПАР, синтезовані за присутності вегетативних клітин *B. subtilis* БТ-2 (МІК щодо тест-культур коливалась в межах від 6 до 10 )

В нашому ж дослідженні найбільш ефективними виявились ПАР синтезовані із внесенням інактивованих клітин *C. tropicalis* в експоненційній фазі росту продуцента (МІК склала 0,8-1,6 проти тих самих тест-культур).

Таблиця 3.3

**Дослідження антимікробних властивостей ПАР, синтезованих штамом *N. vaccinii* ІМВ В-7405 проти дріжджових клітин**

Варіант досліджу	МІК (мкг/мл)		
	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Candida tropicalis</i> живі, лаг-фаза	<b>0.78125</b>	100	<b>1.5625</b>
<i>C. tropicalis</i> живі, експоненційна фаза	<b>0.78125</b>	50	<b>0.78125</b>
<i>C. utilis</i> живі, експоненційна фаза	3.125	25	<b>0.78125</b>
<i>C. utilis</i> , інактивовані, експоненційна фаза	<b>0.78125</b>	25	3.125
<i>C. utilis</i> , живі, лаг-фаза	<b>0.78125</b>	6.25	<b>0.78125</b>
<i>C. utilis</i> , інактивовані, лаг-фаза	<b>1.5625</b>	<b>1.5625</b>	<b>0.78125</b>
<i>C. tropicalis</i> , інактивовані, експоненційна фаза	<b>3.125</b>	<b>3.125</b>	<b>1.5625</b>
Контроль (без індукторів)	100	3.125	12.5

**Висновки:** Так само як і в попередньому експерименті доведено, що незважаючи на кількість синтезованих ПАР, антимікробна активність вища у варіантів ПАР, синтезованих із внесенням в середовище культивування біологічного індуктора. Також встановлено, що МІК найменша для тест-культур, які були індукторами *C.utilis* і *C.tropicalis*. Для *C.albicans* ефективними виявились препарати ПАР, синтезовані із внесенням інактивованих і живих клітин *C.utilis*, в лаг-фазі, а також інактивованих клітин *C.tropicalis* в експоненційній фазі росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405

У попередньому дослідженні [38] найнижча МІК проти *C.albicans* Д-6 була у ПАР, синтезованих у присутності вегетативних клітин *B. subtilis* БТ-2 (МІК склала 7% від контролю).

В проведеному нами експерименті найкращий результат показали ПАР, синтезовані за присутності інактивованих *C.utilis*, внесених у лаг-фазі росту продуцента (МІК щодо дріжджових тест-культур 0,8-1,6).

### **3.3.Вплив внесення дріжджів роду *Candida* на здатність ПАР руйнувати біоплівки**

Як було вказано вище, поверхнево-активні речовини *N. vaccinii* ІМВ В-7405 володіють здатністю руйнувати мікробні біоплівки.

У 2017 році автори в роботі [43] досліджували вплив тривалості культивування (5 або 7 діб), а також внесення  $\text{Ca}^{2+}$  на здатність ПАР руйнувати біоплівку, утворену *E. coli* ІЕМ-1. В дослідженнях використовували супернатант і розчин ПАР. Дослідження показали, що незважаючи на концентрацію, ефективним виявився розчин ПАР при 5-ти денному культивування продуцента як з внесенням катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  так і без них (ступінь руйнування біоплівки становив 73-87%)

В літературі можна знайти інформацію про те, що штам ІМВ В-7405 не єдиний продуцент ПАР, які здатні руйнувати мікробну біоплівку. З статті [44] можна дізнатись, що *Corynebacterium xerosis* NS5 за умов росту на

рафінованій кукуруздяній олії синтезує поверхнево-активні речовини, які активно руйнують біоплівку *E. coli* ATCC 8739 (близько 65%) і трохи слабше біоплівку *P. aeruginosa* ATCC 9027 (близько 30%)

Ще одним яскравим продуцентом ПАР можна назвати бактерії роду *Pseudomonas*. В роботі [45] автори повідомляють про здатність ПАР *P. aeruginosa* ATCC 9027 руйнувати біоплівку, утворену *B. subtilis* ВВК006. Ступінь руйнування досягав 60%. Найвищі показники серед опрацьованої літератури мали ПАР, синтезовані дріжджами роду *Candida*. В статті [46] науковці досліджували здатність ПАР *C. sphaerica* UCP 0995 руйнувати біоплівку *P.aeruginosa* ATCC10145, у деяких випадках ступінь деструкції сягав 80%

Основною нашою задачею в даному експерименті було дослідити, чи впливає внесення біологічного індуктора на посилення здатності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 до руйнування біоплівок. В табл.4 і табл.5 наведені узагальнені дані, отримані під час проведення експериментів.

Таблиця 3.4

**Здатність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих із внесенням біологічних індукторів, до руйнування бактеріальних біоплівок**

Індуктор	Стан клітин індуктора	Фаза росту в якій вносили індуктор	<i>E. coli</i> ІЕМ-1		<i>S. aureus</i> БМС-1		<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	
			1*	2*	1*	2*	1*	2*
<i>Candida tropicalis</i> БВС-65	Живі	Лаг-фаза	97,1	1,5625	-	-	94,4	12,5
		Експоненційна	95,4	1,5625	94,6	50	99	50
	Інактивовані	Експоненційна	98,7	1,5625	-	-	96	12,5
<i>Candida utilis</i> РЕ-2	Живі	Лаг-фаза	95,6	25	-	-	90,1	50
		Експоненційна	91,1	1,5625	-	-	91,2	25
	Інактивовані	Лаг-фаза	96,7	1,5625	-	-	94,3	6,25
		Експоненційна	92,3	1,5625	-	-	-	-
Контроль без індуктора		-	94,4	3,25	96,4	1,5625	92,3	25

Примітка 1: ефективною вважалась концентрація, за якої ступінь деструкції був вище 90%

Примітка 2: «-» означає що жоджа концентрація ПАР не була ефективною проти даної тест-культури

1\* - ступінь деструкції біоплівки (у %)

2\* - найменша ефективна концентрація ПАР (мкг/мл)

Таблиця 3.5

**Здатність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих із внесенням біологічних індукторів, до руйнування дріжджових біоплівок**

Індуктор	Стан клітин індуктора	Фаза росту в якій вносили індуктор	<i>C.utilis</i> БВС-65,		<i>C.tropicalis</i> PE-2	
			1*	2*	1*	2*
<i>Candida tropicalis</i> БВС-65	Живі	Лаг-фаза	92,5	1,5625	94,3	1,5625
		Експоненційна	93	1,5625	95,2	1,5625
	Інактивовані	Експоненційна	-	-	93,2	1,5625
<i>Candida utilis</i> PE-2	Живі	Лаг-фаза	93	200	94,9	1,5625
		Експоненційна	99	100	99	1,5625
	Інактивовані	Лаг-фаза	-	-	91,4	1,5625
		Експоненційна	92	1,5625	98,1	1,5625
Контроль без індуктора		-	-	-	92,4	6,25

Примітка 1: ефективною вважалась концентрація, за якої ступінь деструкції був вище 90%

Примітка 2: «-» означає що жодна концентрація ПАР не була ефективною проти даної тест-культури

1\* - ступінь деструкції біоплівки (у %)

2\* - найменша ефективна концентрація ПАР (мкг/мл)

Аналізуючи дані, отримані з таблиць 2.4 і 2.5 зробили висновок, що найбільш ефективними препаратами ПАР виявились проти бактеріальних тест-культур *E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2 (спори), а також проти дріжджів, які раніше виступали в ролі індукторів синтезу і активності ПАР. В таблицях немає даних про *C.albicans* Д-6 і *B. subtilis* БТ-2 (вегетативні), це пов'язано з тим, що жодна концентрація ПАР не спричинювала руйнування біоплівки. Для *B. subtilis* БТ-2 (вегетативні) найкращий результат показав розчин ПАР синтезований із внесенням живих клітин *C.tropicalis* у лаг-фазі продуцента. За концентрації 200 мкг/мл ступінь деструкції становив 84,9%. У руйнуванні біоплівки *C.albicans* Д-6 найбільш ефективним виявився препарат ПАР, синтезований із внесенням інактивованого індуктора *C.utilis* у лаг-фазі продуцента, проте ступінь деструкції становив лише 47,9%.

Порівнюючи отримані результати з результатами руйнування біоплівки за умов росту продуцента на відпрацьованій соняшниковій олії за присутності бактеріальних індукторів [40], можемо зробити висновок, що дріжджові індуктори впорались краще. Ступінь деструкції біоплівок *E.coli* ІЕМ-1 *B. subtilis* БТ-2 *Pseudomonas sp.* МІ-2 в роботі [40] коливається в межах 78-92% , тоді як у наших дослідженнях більшість препаратів ПАР показали результат більш як 95% деструкції для всіх тест-культур.

#### **3.4.Вплив внесення біологічних індукторів на антиадгезивну активність ПАР**

Антиадгезивна властивість ПАР штаму ІМВ В-7405 вперше була описана у 2014 році [47]. Для дослідження антиадгезивних властивостей, використовували поверхні (зубні протези, кахель, нержавіюча сталь, пластик, лінолеум, також використовували медичні силіконові катетори) попередньо оброблені препаратами з ПАР ( 0,009 мкг/мл). Ступінь адгезії визначали методом Коха і спектрофотометричним способом. Як антиадгезивні агенти використовували супернатант і екстраговані з супернатанту сумішшю Фолча ПАР.

Дослідники встановили, що найбільш ефективним виявився препарат ПАР. Після обробки поверхонь катеторів адгезія дріжджів *Candidaalbicans* Д-6 і більшості бактерій була нижча на 20-30%, ніж при обробці тих самих поверхонь препаратом культуральної рідини.

Обробка пластику, лінолеуму і кахелю препаратами культуральної рідини і ПАР в концентрації ПАР 0,01 мкг/мл показала, що адгезія клітин *B. subtilis* БТ-2 знижувалась на 60-80% і 75-80% відповідно.

Препаратами в концентрації 0,009 мг/мл обробляли ті ж самі поверхні для перевірки антиадгезивної активності проти грибів *Aspergillus niger* Р-3 і *Fusarium culmorum*. Препарати культуральної рідини і ПАР виявились однаково ефективними. Адгезія клітин знижувалась на 50-65% по відношенню до контрольного зразка, який не оброблявся препаратами.

Автори статті [48] перевіряли ефективність дії ПАР на силіконових катерорах і зубних протезах. Обробка абіотичних поверхонь препаратами ПАР з концентрацією 0,064 мг/мл впродовж 2 годин знизила адгезію *C.albicans* Д-6, *B.subtilis* БТ-2 і *E.coli* ІЕМ-1 на 42-82%.

В нашому експерименті для дослідження впливу внесення в середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 дріжджових індукторів на антиадгезивні властивості ПАР використовували абіотичні поверхні: скло метал і кахель. Для перевірки активності дії ПАР обрали 6 тест-культур: бактеріальні клітини *E. coli* ІЕМ-1, *S. aureus* БМС-1, *B. subtilis* БТ-2, та 3 вида дріжджів роду *Candida*.

Експеримент не завершено.

Під час проведення експерименту і обробки результатів, а також аналізу літературних даних було зроблено такі висновки:

1.Зменшення концентрації синтезованого цільового продукту не впливає на зниження його біологічних властивостей, а навпаки індуктори підвищують їх

2.Встановили, що внесення в середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 конкурентних мікроорганізмів підвищує антимікробну

активність ПАР проти досліджуваних тест-культур, а також їх здатність до руйнування біоплівки (враховуючи дослідження попередніх років [38,40])

3.Визначили, що внесення в середовище культивування дріжджових індукторів (*Candida utilis* БВС-65 та *Candida tropicalis* PE-2) є більш ефективним, ніж внесення бактеріальних індукторів (знизилась мінімальна інгібуюча концентрація щодо *B. subtilis* БТ-2 (вегетативні клітини), *B. subtilis* БТ-2 (спори) *E. coli* ІЕМ-1)

4.Дріжджові індуктори також сприяють збільшенню ступеню деструкції біоплівки бактеріальних клітин з 78-92% [40] до близько 95% (середнє значення для досліджених тест-культур).

5.Найефективнішим антимікробним агентом проти мікробних клітин виявились ПАР, синтезовані за присутності інактивованих клітин *C. tropicalis*, внесених в експоненційній фазі росту продуцента, а проти дріжджових – ПАР, синтезовані у випадку внесення інактивованих *C.utilis* у лаг-фазі.

6. У деструкції біоплівок найкраще проявили себе ПАР, утворені за присутності живих клітин *C. tropicalis*, внесених в експоненційній фазі росту (деструкція біоплівок бактеріальних тест-культур 95-99%, дріжджових – 92-94%),

## ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

#### 4.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту та вибору поживного середовища для його культивування

Серед бактерій роду *Nocardia* мало представників, які синтезують ПАР. Серед найвідоміших продуцентів ПАР гліколіпідної природи виділяють *N. vaccinii* IMB B-7405. Штам К-8 – штам, що виділений із забруднених нафтою зразків ґрунту. Штам зареєстровано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України за номером IMB B-7405 [3].

*N. vaccinii* IMB B-7405 може стати промислово важливим мікроорганізмом, оскільки окрім властивостей синтезованих ним ПАР (антимікробна, антиадгезивна, деструкція нафти), штам можна вирощувати на відходах виробництв, що значно здешевлює процес культивування. Наприклад, дослідники в роботі [49] повідомляють, що синтез мультифункціональних ПАР *N. vaccinii* може реалізовуватись на ароматичних субстратах ( фенол, бензол, нафталін, толуол, гексахлорбензол, бензойна кислота), які є ксенобіотиками. Агентство з охорони навколишнього середовища США встановило, що ксенобіотики ароматичної природи належать до групи найнебезпечніших забруднювачів довкілля [49].

При рості штаму IMB B-7405 на гліцерині, синтез позаклітинних ПАР становить близько 2,0 г/л. Проте не зважаючи на порівняно малу концентрацію цільового продукту, він має досить високі антимікробні та антиадгезивні показники .

					НУХТ БТЕК 04.01.01 ДР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	53	Царьова А.М.				10	24
Перевір.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ		
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

Проте існують штами, які синтезують низькомолекулярні ПАР в складі яких виявлені гліколіпіди. Одним з таких представників є *N. otitidiscaviarum* 6471, виділений з забрудненої нафтою морської води біля берегів Алангу, Індія. За допомогою інфрачервоної спектроскопії ідентифікували, що ПАР, синтезовані даним мікроорганізмом належать до рамноліпідів [50]. В статті [50] також повідомляється про участь штаму 6471 в деструкції нафти, тому доцільно буде порівнювати його зі штамом ІМВ В-7405, який має таку саму властивість.

Для порівняння продуцентів ПАР також було обрано бактерії *Pseudomonas aeruginosa* EM1 і *N. amarae* NRRL В-8176, які синтезують цільовий продукт за умови росту на оливковій олії [51,52]. Цей спосіб може бути вигідним для Італії та близьких до неї країн, де даний субстрат коштує дуже дешево. В умовах нашої країни спосіб культивування з використанням як джерела вуглецю оливкової олії є невигідним, оскільки вартість її сягає 100 грн за літр.

Обраних продуцентів порівнюють за концентрацією продукту, тривалістю його утворення та особливостями технологічного процесу (табл.2.1.).

Так концентрація поверхнево-активних речовин, синтезованих штамом ІМВ В-7405 на середовищі з очищеним гліцерином (1% об) складає 2,0г/л, в той час як концентрація ПАР синтезованих *N. amarae* NRRL В-8176 при рості на оливковій олії складає 1,8 г/л. Не зважаючи на те, що інші штами синтезують більше поверхнево-активних речовин, ПАР штаму ІМВ В-7405 є економічно вигіднішими, оскільки їх властивості в декілька порядків вищі, ніж у порівнюваних штамів.

Таблиця 4.1.

**Поживні середовища для культивування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, *Nocardia otitidiscaviarum* 6471, *Pseudomonas aeruginosa* EM1 і *Nocardia amarae* NRRL B-8176 для отримання ПАР**

Продуцент (біологічний агент)	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація ПАР г/л	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Гліцерин – 12,6; NaNO <sub>3</sub> – 0,5; MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0,1; CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O – 0,1; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,1; FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0,001, дріжджовий автолізат – 0.25	2,0	120	Культивування проводилось в колбах 750 мл на качалках зі 100 мл поживного середовища, при оптимальному рН 6,8 – 7	<i>Пирог Т.П., Никитюк Л.В., Макієнко В.О., Шевчук Т.А., Ігуїнська Г.О.</i> Регуляція антимікробної активності поверхнево- активних речовин, синтезованих <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B- 7405 // Мікробіол. Журн. – 2017. – 79, - №3 [50]
<i>N. otitidiscaviarum</i> 6471	Сира нафта – 5; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0.75; дріжджовий екстракт – 1; MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0.5; NaCl – 5; CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O – 0.5; MnSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O – 0.5; FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0.5;	3,5	168	Культивування проводилось в колбах на качалках при оптимальній температурі t = 25°C	<i>T. K. Vyas, B. P. Dave</i> Production of biosurfactant by <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> and its role in biodegradation of crude oil // Environ. Sci. Tech. – 2011. – 8, N2. – P. 425-432 [51]

<i>N. amarae</i> NRRL B-8176	Оливкова олія – 27,48; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 0,46; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,1; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,1; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O – 0,1; Дріжджовий автолізат – 0,2;	1,8	168	рН середовища культивування 6,0, вирощують в колбах на качалках	<i>Tarek A.A. Moussa, Gaber M. Ahmed, Shereen M.S Abdel-Hamid</i> Mathematical model for biomass yield and biosurfactant production by <i>Nocardia amarae</i> //
<i>P. aeruginosa</i> EM1	Оливкова олія – 80,0 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 3, 4; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 4.08; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 5.68; CaCl <sub>2</sub> – 0,00077 MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O – 0.2; Натрію EDTA – 0,0015 FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O – 0,00056	3,7	168	Культивування проводили в колбах 500 мл на качалках; рН середовища 6,8, підтримували за допомогою 1N HCl; t = 37°C	<i>Jane-Yii Wu , Kuei-Ling Yeh , Wei-Bin Lu , Chung-Liang Lin , Jo-Shu Chang</i> Rhamnolipid production with indigenous <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM1 isolated from oil-contaminated site // <i>Bioresource Technology</i> . – 2008. – 99. – P. 1157-1164 [52]

Порівняння вигідності і ефективності продуцентів цільового продукту також базується на визначенні вартості поживного середовища. В табл.2.2показано розрахунок вартості 1 л поживного середовища, виявилось що середовище культивування для *N. vaccinii* IMB B-7405 є дешевшим приблизно в 2-4,5 рази порівняно з іншими, що також є перевагою для використання як продуцента ПАР саме цього штаму.

Таблиця 4.2

**Вартість поживних середовищ для культивування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, *Nocardia otitidiscaviarum* 6471, *Pseudomonas aeruginosa* EM1 і *Nocardia amarae* NRRL B-8176**

Продуцент (біологічний агент)	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента на 1 л середовища, грн	Джерело* (1,2)
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Гліцерин – 12,6;	29,64	0,3735	2
	NaNO <sub>3</sub> – 0,5;	19,0	0,0095	1
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0,1;	8,0	0,0008	1
	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O – 0,1;	12,0	0,0012	2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,1;	42,0	0,0042	2
	FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0,001,	1,9	0,0000019	2
	дріжджовий автолізат – 0.25	979,33	0,2449	1
Вартість 1 л середовища = 0,641 грн				
<i>N. otitidiscaviarum</i> 6471	Сира нафта – 5;	11,0	0,055	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1;	5,75	0,00575	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,5;	42,0	0,063	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0.75;	43,5	0,032625	1
	дріжджовий екстракт – 1;	979,33	0,97933	1
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0.5;	8,0	0,004	2
	NaCl – 5;	5,2	0,026	1
	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O – 0.5;	12,0	0,006	2
	MnSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O – 0.5;	23,5	0,01175	2
	FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 0.5;	1,4	0,0007	2
	Вартість 1 л середовища = 1,184 грн			
<i>N. amarae</i> NRRL B-8176	Оливкова олія – 27,48	98,0	2,69304	2
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 0,46;	10,8	0,004968	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,1;	42,0	0,0042	1

	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,1;	23,5	0,00235	1
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O – 0,1	12,0	0,0012	2
	Дріжджовий автолізат – 0,2	979,33	0,195866	1
	Вартість 1 л середовища = 2,902 грн			
<i>P.aeruginosa</i> EM1	Оливкова олія – 73,28	98,0	7,67	2
	NH <sub>4</sub> NO – 3, 4;	11,50	0,039	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 4.08;	43,50	0,177	1
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 5.68;	25,0	0,142	1
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O – 0.2;	8,0	0,0016	1
	CaCl <sub>2</sub> – 0,00077	12,0	0,00000932	2
	Натрію EDTA – 0,0015	75,0	0,0001125	2
	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O – 0,00056	1,40	0,000000784	2
	Вартість 1 л середовища = 8,027			

**Примітка.** \* - ціни наведено станом на березень 2019 року. 1 <https://prom.ua/> ; 2 <https://herson.flagma.ua>

Заключним етапом у визначення найкращого продуцента ПАР є розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту, а також кількість утворених ПАР за 1 год культивування. Як наведено в *табл.2.3* умовна вартість 1 г ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 складає 0,438 грн, в той час як 1 г ПАР, синтезованих штамом NRRL B-8176 у 4 рази дорожчий. Не зважаючи на найбільший серед порівнюваних штамів вихід цільового продукту у *P.aeruginosa* EM1, вартість 1 г ПАР у нього найвища.

Ще однією перевагою використання *N. vaccinii* IMB B-7405 є менша тривалість культивування порівняно з іншими штамми ( за 120 год за присутності індуктора штам IMB B-7405 синтезує 1,46 г/л цільового продукту), а культивування штамів 6471 і NRRL B-8176 триває 168 годин, що збільшує витрати на отримання ПАР.

**Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин при  
культивуванні *Nocardia vaccinii* IMBB-7405 *Nocardia otitidiscaviarum* 6471  
і *Nocardia amarae* NRRL B-8176 і *Pseudomonas aeruginosa* EM1**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ПАР, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР за 1 год, г/год
<i>N. vaccinii</i> IMBB-7405	0,64	2.0	0,32	120	0,012
<i>N. otitidiscaviarum</i> 6471	1,18	3.0	0.39	168	0.002
<i>N. amarae</i> NRRL B-8176	2,90	1,8	1,6	168	0,01
<i>P. aeruginosa</i> EM1	8,027	3,7	2,17	168	0,022

Отже, для отримання ПАР найбільш ефективним і економічно вигідним виявився продуцент *N. vaccinii* IMB B-7405, як видно з табл.2.1 у нього найменша тривалість культивування ( 120 год) і відносно високий вихід цільового продукту ( 2,0 г/л). Крім того в табл. 2.2 показано, що найдешевше середовище культивування у штаму IMB B-7405 ( 0,64 грн), а отже як видно з табл. 2.3 умовна вартість 1 г цільового продукту також буде дешевою ( 0,438 грн). Не зважаючи на те, що кількість утворених ПАР за 1 год більша у *P. aeruginosa* EM1 ( 0,022 г/год), у нього вартісне поживне середовище ( близько 9 грн), а тому і вартість 1 г продукту буде високою.

## 4.2. Техніко-економічне обґрунтування

### 4.2.1 Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проєкті пропонується використання поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, з високою антимікробною активністю, у складі мийно-дезінфікуючих засобів для миття горизонтальних зерносховищ.

### Загальна характеристика зерносховищ

Зерносховище – будівля або споруда, призначена для зберігання зерна. В даному випадку розглядаємо безкаркасні зерносховища наземного типу з оцинкованої сталі (рис. 1)

Оскільки Україна – аграрна країна і один з найбільших експортерів зерна і борошна в Європі, важливим є забезпечити якісне і безпечне зберігання продукції. У 2018 році з України було експортовано 37,43 млн т зернових культур [52]. Станом на 28 серпня 2019 на зовнішні ринки було відправлено 7,616 млн т зерна. [54].

Найпоширенішою зерновою культурою в Україні є озима пшениця, посіви якої займають, залежно від року, 6,4— 7,3 млн га землі. До 90 % площ її зосереджені у степовій і лісостеповій зонах і лише близько 10 % — у поліській [55].



Рис.2 Горизонтальне зерносховище наземного типу

## Шкідники, що спричинюють псування зерна

Значна частина шкідників потрапляє до складських приміщень разом із зерном та іншою сільськогосподарською продукцією, тарою, а також через одяг, взуття працівників, загрозу становлять також гризуни і птахи. Живлячись зерном, шкідники забруднюють його своїми рештками внаслідок линяння, загиблими особинами, екскрементами, павутиною. Заражене шкідниками зерно змінює свій колір, запах і смакові якості [56].

Негативна дія мікроорганізмів є основним чинником зниження якості зерна і його псування. У процесі збирання й обробки при контакті насіння з пиловидними часточками ґрунту кількість і видовий склад мікроорганізмів в зерні різко збільшуються. В 1 г зернової маси містяться десятки або сотні тисяч, інколи мільйони мікроорганізмів [57].

До 60% збудників хвороб бактеріального і грибного походження, що, врешті-решт, позначається на врожаї і на їхній якості, потрапляють на склади разом із зібраним врожаєм. Оскільки під час зберігання зерна створюються довготривалі і дуже сприятливі умови (температура, волога, доступність кисню – в деяких місцях постійно відбувається аерація, а в деяких створюються майже анаеробні умови), бактерії, а також інші мікроорганізми, що несуть загрозу якості зерна починають розвиватися дуже швидко. Значення економічних збитків, які завдають бактеріальні та вірусні інфекції, плісневі гриби важко переоцінити, оскільки вони знижують кількість придатного до подальшої обробки зерна на 30-60%. Рослини уражаються багатьма патогенними та споровими мікроорганізмами. Це бактерії групи *Enterobacteriaceae* та плісневі гриби роду *Fusarium* (*F. nivale*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*), *Tilletia* (*T. caries* та *T. controversa*), *Cladosporium* (*C. herbarum herbarum*), *Claviceps* (*C. purpurea*), бактерії роду *Bacillus*, *Penicillium spp.*, *Epicoccum spp.*, *Trichothecium spp.* і т. д. Ураження такими мікроорганізмами перешкоджає нормальному зберіганню, і впливає на якість зерна, і як наслідок – на продукцію, що виготовляється з нього. А спори цих бактерій, потрапляючи в організм

людини, здатні викликати досить серйозні порушення функціонування імунної системи, шлунково-кишкового тракту, органів дихання, нервової системи [58].

В табл.1 дослідники представили наявну кількість мікроорганізмів в зразках пшениці. Зразок №1 досліджувався без обробки препаратами, зразки 2 і 3 оброблені препаратами бактерицидної та фунгіцидної дії [59].

Табл.4.4

2. Результати досліджень загальної кількості бактерій та плісневих грибів зразків пшениці

Зразки зерна	Загальна кількість, КУО в 1 г	Розведення						
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	
№ 1	Загальна кількість бактерій	$2,7 \times 10^7$	Суцільний ріст	Суцільний ріст	Суцільний ріст	1748	260	29
	Загальна кількість плісневих грибів	$2,0 \times 10^7$	Суцільний ріст	Суцільний ріст	Суцільний ріст	1205	196	21
№ 2	Загальна кількість бактерій	$7,0 \times 10^3$	682	69	7	0	0	0
	Загальна кількість плісневих грибів	$1,4 \times 10^3$	165	14	1	0	0	0
№ 3	Загальна кількість бактерій	$1,8 \times 10^3$	227	14	0	0	0	0
	Загальна кількість плісневих грибів	$7,8 \times 10^2$	76	8	0	0	0	0

### Антимікробна обробка зерносховищ

Зважаючи на те, що мікроорганізми завдають непоправну шкоду зерновим культурам під час зберігання, агрофірми повинні звести до мінімуму ризик зараження зерна. Одним із найбільш ефективних способів збереження якості зерна – це антимікробна обробка складських приміщень.

Оскільки в сучасній літературі немає даних про наявність спеціальних антимікробних засобів для зерносховищ, аграрії користуються звичайними дезінфікуючими мийними засобами. В табл.2 наведені дезінфектанти, які пропонує одна з українських агрофірм, яка займається обслуговуванням елеваторів та інших зерносховищ.

## Засоби для дезінфекції зерносховищ

Назва	Склад	Дія	Примітка
<b>Віроцид</b>	Амонієві сполуки, дидецилдиметиламоній хлорид, алкілдиметилбензил амонію хлорид, глутаровий альдегід, ізопропанол, дириват терпентину	Антимікробна дія, активний проти грам+ і грам- бактерій (включаючи мікобактерії, збудники туберкульозу і споруотворюючі форми), а також вірусів і грибів	Відносять до помірно небезпечних речовин (3 клас не-безпеки згідно ГОСТ 12.1.007-76)
<b>Вірекс</b>	калію пероксомоносульфата, сульфаминової кислоти, діхлорізоціанурат натрію	Проти вірусів, грибів і бактерій,	Помірно небезпечна речовина, сильний окисник. Готують 1%-й р-н. витрати 300 мл/м <sup>2</sup> , експозиція – 15-60 хв. Часто виникають труднощі з приготуванням розчину
<b>Стеріокс</b>	В мас. %: надоцтова к-та 12-15; пероксид водню 20-25; оцтова к-та 18-30; вода, стабілізатори до 100	Бактерицидна, фунгіцидна (ефективний проти плісняви), віруцидна.	Помірно небезпечна речовина. Готують 0,005-0,1%-й р-н по діючій речовині (надоцтова к-та). Витрати 100-150 мл/м <sup>2</sup>
<b>ФАН</b>	суміш на основі четвертинних амонієвих сполук і допоміжних компонентів (у т.ч. суміш кислот, поверхнево активні речовини, вода)	Бактерицидна (в тому числі щодо <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus hirae</i> ), туберкулоцидна, віруліцидна (зокрема, щодо збудників грипу, гепатитів В, С і СНІД) і фунгіцидна (щодо грибів роду <i>Candida</i> , дерматофітів і пліснявих грибів, у тому числі в споривій формі)	Ефективний при концентраціях 0,3-2,0 % за препаратом, експозиція триває 5-10 хв, витрати 150-200 мл/м <sup>2</sup>
<b>Дезекон</b>	В мас. % Синергетична дидецилдиметиламоніум хлорида 9,0; амінопропілдодецилропандіаміну 5,0; полігексаметилгуані	Бактерицидна, фунгіцидна, віруліцидна (за високих температур бактерицидна дія в рази збільшується)	Готують 0,02-5,0%-й р-н. Витрати 100-150 мл/м <sup>2</sup> . Можна застосовувати різні способи обробки (механічних або вручну)

	д гідрохлорида 0,98 (діюча речовина); допоміжні речовини: сурфактант, барвник, регулятор рН, ароматизатори		
<b>Саніфект</b>	100 мл розчину містять: п- алкіл диметил бензил амоній хлорид - 4,5 г; п- алкіл диметил етилбензил амоній хлорид - 4,5 г; допоміжні речовини (поверхнево-активні речовини, регулятори рН, комплексоутворюючі речовини, інгібітори корозії, барвник, ароматизатор, вода) - 91,0 г.	Бактерицидна, фунгіцидна, віруліцидна	Витрати 250-300 мл/м <sup>2</sup> (для зрошування) , готують 0,8-3,8 %-й р-н. Експозиція 10-15 хв.

Згідно з даними, наведеними в *табл. 2*, більшість мийно-дезінфікуючих засобів, що використовують аграрії відносяться до помірно небезпечних, а до складу всіх препаратів входять хімічні сполуки, що несуть загрозу екологічному стану країни та здоров'ю людини.

### **Переваги використання ПАР *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 у якості мийно-дезінфікуючих засобів для обробки елеваторів**

Як показали дослідники в роботах [60-61], ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 проявляють високу антибактеріальну здатність проти багатьох штамів мікроорганізмів, в тому числі і грибів.

Оскільки штам ІМВ В-7405 депонований в інституті мікробіології та вірусології ім. Заболотного, він не є патогенним і не несе шкоди організму людини, тому є цілком безпечним для використання.

Перевагами використання ПАР штаму ІМВ В-7405 є можливість росту на дешевих субстратах ( відпрацьована олія, відходи біодизелю, очищений і технічний гліцерин) [39]. В роботі [38] зазначено, що антимікробну активність ПАР можна регулювати за допомогою внесення різної концентрації субстрату, а також внесенням індукторів у різних фазах росту. На *рис. 2* наведено антимікробну дію ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 щодо деяких штамів мікроорганізмів. [39]

Таблиця 3

Мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин  
*N. vaccinii* ІМВ В-7405 щодо бактерій, дріжджів і грибів

Мікроорганізми	Назва	МІК, мкг/мл
Бактерії	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	11,5
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори )	22,5
	<i>E. cloaceae</i> С-8	85,0
	<i>E. aroideae</i> Н-3	45,0
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	85,0
	<i>P. vulgaris</i> ПА-12	45,0
	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	85,0
	<i>S. aureus</i> БМС-1	85,0
Дріжджі	<i>C. albicans</i> ВІ-4	11,5
	<i>C. guilliermondii</i> МК-7	22,5
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	22,5
	<i>C. utilis</i> ЕІ-8	11,5
Гриби	<i>A. niger</i> Р-3	325,0
	<i>F. culmorum</i> Т-7	165,0

**Рис 3.** МІК поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405

Відомо, що під час росту на різних поверхнях мікроорганізми утворюють біоплівки, які слугують їх захистом від несприятливих умов. Через утворені біоплівки дезінфікуючим препаратам важче проникати в клітину, тим самим знижується їх активність. Дослідники вказують, що ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 виявляють здатність до руйнування біоплівок. Під час своєї життєдіяльності, мікроорганізми прикріплюються до різних поверхонь ( метал, скло, пластик, кахель) [48]. Дослідники в роботах [48-49] показали також антиадгезивні властивості ПАР штаму ІМВ В-7405.

### 4.3 Розрахунок річної потреби

Для розрахунку річної потреби продукту обираємо Тернопільську область. У 2018 році там зібрали 712250 т пшениці [62-63].

Варто зазначити, що зерно зберігають не тільки в зерносховищах представленого вище типу. Використовують також елеватори та металеві силоси. Проте, експериментально прийємо, що все зібране зерно зберігається в обраних нами безкаркасних зерносховищах.

ЧП "Скляр А.І."(раніше ПКП Стройекс) буде зерносховища різних розмірів, обираємо середній розмір, з місткістю 1000 т: довжина 20 м, ширина 15 м, висота – 3,5 м. [64]. Тоді для зберігання 712250 т зерна необхідно використати:

$$712250 / 1000 = 713 \text{ зерносховищ.}$$

Далі необхідно визначити площу приміщення, яку необхідно буде мити. Для цього потрібно вирахувати площу поверхні підлоги, стелі та стін. Прийємо, що наше зерносховище має форму прямокутника, тоді:

$$\text{Підлога і стеля: } 20\text{м} \times 15\text{м} = 300 \text{ м}^2$$

$$\text{Стіни: } 20\text{м} \times 3,5\text{м} = 70 \text{ м}^2$$

Отже загальна площа миття для прийнятого нами зерносховища прямокутної форми становить:  $300+300+70+70 = 740 \text{ м}^2$ . Враховуючи, що безкаркасне зерносховище має форму купола, то загальну площу для миття і обробки ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 прийємо рівною **675 м<sup>2</sup>**.

Нормою витрат вважають 100-300 мл/ м<sup>2</sup> робочого розчину для миття та дезінфекції. Для миття зерносховищ витрати будуть становити 100 мл/ м<sup>2</sup>.

За умови росту *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на гліцерині штам синтезує 2,0 г/л ПАР з антимікробними властивостями. Ефективною концентрацією для знищення бактерій, грибів та дріжджів є 200 мкг/мл. Тому для миття та дезінфекції приміщення для зберігання зерна варто використовувати супернатант (в якості робочого розчину) саме з такою концентрацією антимікробних ПАР.

Розрахуємо витрати продукту для обробки 1 зерносховища:

$$0,1 \times 675 \text{ м}^2 = 67,5 \text{ л робочого розчину}$$

Тоді для обробки 713 зерносховищ необхідно використати:

$$67,5 \times 713 = 48128 \text{ л робочого розчину.}$$

Отже, для обробки 713 зерносховищ безкаркасного типу необхідно 48128 л розчину супернатанту з ефективною концентрацією ПАР – 200 мкг/мл.

Далі розраховуємо кількість ПАР, яка міститься в 48128 л робочого розчину для миття та дезінфекції:

$$48128 \times 0,2 = 9626 \text{ г,}$$

Де 0,2 – ефективно концентрація ПАР (200 мкг/мл)

Розраховуємо кількість культуральної рідини, де буде міститись 9626 г ПАР:

2 г ПАР міститься в 1 л культуральної рідини, тоді:

$$9626 \text{ г ПАР} - X \text{ л}$$

$$2 \text{ г ПАР} - 1 \text{ л,}$$

$$X = 9626 / 2 = 4813 \text{ л культуральної рідини.}$$

Отже, для миття і дезінфекції 713 зерносховищ загальною площею 481275 м<sup>2</sup> необхідно насинтезувати 4813 л культуральної рідини, де буде міститись 9626 г ПАР з антимікробною активністю.

#### **4.3.1 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405**

Враховуючи загальну кількість культуральної рідини, яку необхідно насинтезувати, для того щоб обробити 713 зерносховищ на рік розраховуємо кількість культуральної рідини, яку потрібно отримати за 1 ферментацію (1 цикл).

Оскільки врожай пшениці збирають сезонно (серпень і вересень), то необхідно швидко підготувати робочі розчини для обробки приміщень для зберігання зерна. Приймемо, що кількість робочих трудоднів становитиме 30 ( $T_{рд} = 29$ ). Інші 336 днів підприємство буде працювати для синтезу ПАР, що будуть використовуватись в інших цілях.

Розрахуємо кількість продукту, яку необхідно отримати за 1 добу:

$$V_{нд} = V_{гп} / T_{рд} = 4813 / 29 = 166 \text{ л за 1 добу.}$$

Враховуючи, що цикл роботи ферментера ( $T_{\text{фц}}$ ) складається з таких частин : мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 72 год, вивантаження культуральної рідини – 1 год, кількість продукту за 1 цикл становитиме:

$$V_{\text{цкл}} = V_{\text{нд}} \times T_{\text{фц}} / 24 = 166 \times 79 / 24 = 547 \text{ л}$$

Тоді, кількість циклів на 30 трудоднів буде становити:

$$N_{\text{цкл}} = V_{\text{нт}} / V_{\text{цкл}} = 4813 / 547 = 8,79 = 9 \text{ циклів.}$$

Кількість культуральної рідини за 1 цикл ферментації становитиме (л/цикл):

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times V_{\text{цкл}} \times P_{\text{гп}} / P_{\text{ст}} \times (1 - E_{\text{св}}) = 1,21 \times 547 \times 100 / 98 (1 - 0,1) = 750,5 = 751 \text{ л}$$

$K_1$  – коефіцієнт, який враховує можливість нестерильних операцій;

$P_{\text{ст}}$  - вміст цільового продукту (ПАР) в культуральній рідині (враховуючи вміст біомаси – 2 г/л );  $P_{\text{гп}}$  – готовий продукт ( супернатант 100% об.);  $E_{\text{св}}$  – втрати цільового продукту 10%. До  $E_{\text{св}}$  ми відносимо втрати при центрифугуванні (очищення культуральної рідини від біомаси і отримання супернатанту), а також втрати при розливі у ємності для зберігання і транспортування.

751 л культуральної рідини можна отримати в ферментері з геометричним об'ємом (з коефіцієнтом заповнення  $K_3 = 0,6$ , межі – 0,5-0,65):

$$V_{\text{геом}} = V_{\text{кр}} / 0,6 = 751 / 0,6 = 1251,6 \text{ л}$$

За ГОСТ 20680-2002 [65] найближчий за геометричним об'ємом ферментер –  $V_{\text{ф}} = 1,25 \text{ м}^3$  (1250 л), тоді перераховуємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = V_{\text{кр}} / V_{\text{ф}} = 751 / 1250 = 0,6008 \text{ що відповідає заданим межам.}$$

Отже, для отримання 751 л культуральної рідини обрано ферментер з номінальним геометричним об'ємом  $1,25 \text{ м}^3$ .

#### 4.3.2. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері та інокуляторах

##### 4.3.2.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для виробничого біосинтезу

За 1 виробничий цикл отримують 751 л культуральної рідини.

Розраховуємо кількість поживного середовища і посівного матеріалу (ПМ) для виробничого біосинтезу (розрахунок проводять враховуючи втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря – 10%):

$$V_{\text{роб1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{751}{1 - 0,1} \approx 834,4 = 835 \text{ л}$$

$E_{\text{ф}}$  – втрати культуральної рідини під час виробничого біосинтезу.

Перерахуємо коефіцієнт заповнення для виробництва 830 л культуральної рідини: при обраному коефіцієнті заповнення  $K_3 = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{\text{ф.1}} = 835/0,6 = 1391,7$  л. Для зручності обираємо ферментер з геометричним об'ємом  $1,5 \text{ м}^3$  (такий ферментер може виготовити під замовлення ТОВ **BIORUS** (<https://bio-rus.ru/>)). Тоді коефіцієнт заповнення буде становити:

$$K_3 = 835 / 1500 = 0,557, \text{ що допустимо і знаходиться в межах норми.}$$

Для виробництва ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 кількість ПМ становить 10% від об'єму поживного середовища (ПС). Тоді, кількість ПС у ферментері об'ємом  $1,5 \text{ м}^3$  буде дорівнювати:

$$V_{\text{ПС1}} = \frac{V_{\text{роб1}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{835}{1 + 0,1} \approx 759,1 = 760 \text{ л}$$

$X_{\text{ф}}$  – кількість посівного матеріалу для ферментера об'ємом  $1,5 \text{ м}^3$

Тоді, кількість ПМ для ферментера об'ємом  $1,5 \text{ м}^3$  становитиме:

$$V_{\text{ПМ1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{ПС1}} = 835 - 760 = 75 \text{ л}$$

#### 4.3.2.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування інокуляту в посівному апараті для засіву ферментера об'ємом 1,5 м<sup>3</sup>

Для одержання 75 л посівного матеріалу необхідно врахувати втрати, що відбуваються в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_i = 10\%$ )

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{75}{1 - 0,1} = 83,4 \text{ л}$$

Для вирощування такої кількості ПМ обираємо інокулятор з геометричним об'ємом 150 л. Перевіряємо коефіцієнт заповнення:  $K_z = 83,4 / 150 = 0,56$  (знаходиться в межах норми).

Розраховуємо кількість ПС в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{83,4}{1 + 0,1} = 75,82 \text{ л}$$

Тоді кількість ПМ для даного інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 83,4 - 75,82 = 7,58 \text{ л}$$

#### 4.3.2.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для засіву інокулятора об'ємом 150 л

Щоб отримати 7,58 л ПМ необхідно як і в попередніх етапах врахувати втрати, які виникають в результаті краплевиносу (10%)

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{7,58}{1 - 0,1} = 8,43 \text{ л}$$

На даному етапі обираємо інокулятор об'ємом 15 л. Перевіряємо коефіцієнт заповнення:  $K_z = 8,43 / 15 = 0,562$  (перебуває в межах норми)

Кількість ПС в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{8,43}{1 + 0,1} = 7,67 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість ПМ для інокулятора об'ємом 15 л:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 8,43 - 7,67 = 0,76 \text{ л}$$

#### 4.3.2.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для засіву інокулятора об'ємом 15 л

0,76 л інокуляту (760 мл) у виробничих умовах можна отримати вирощуючи ПМ в колбах на качалках. Використовують колби об'ємом 750 мл які заповнюють 150 мл ПС.

Розраховуємо необхідну кількість інокуляту з урахуванням втрат ( $E_{\text{колб}} = 0,01\%$ ):

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{пмз}}}{1 - E_{\text{колб}}} = \frac{0,76}{1 - 0,01} = 0,77 \text{ л} = 770 \text{ мл.}$$

Далі потрібно розрахувати кількість колб для вирощування 770 мл інокуляту:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{770}{750 \times 0,2} = 5,1 = 6 \text{ колб}$$

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1500 л з коефіцієнтом заповнення 0,557 складається з 3-х стадій.

Підсумуємо, що для отримання культуральної рідини з ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 необхідно забезпечити виробництво ферментером об'ємом 1500 л, інокуляторами об'ємами 150, 15 л також качалочними колбами.

#### 4.4. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва

##### 4.4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для культивування аеробного штаму актинобактерій *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 оптимальними умовами росту є температура 26-28 °С, значення рН середовища в межах 6,0-7,0. Такі умови є сприятливими для розвитку багатьох інших нейтрофільних і мезофільних мікроорганізмів, тому обираємо асептичний спосіб культивування.

Оскільки ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 є позаклітинними метаболітами, необхідним є накопичення максимальної кількості цільового продукту в

середовищі культивування, для цього обираємо глибинне культивування, а не поверхневе.

Глибинне культивування може проходити періодично і безперервно. Не зважаючи на те, що безперервне культивування має ряд переваг, оскільки інтенсивний синтез ПАР спостерігається в стаціонарній фазі, обираємо періодичне культивування.

Бактерії *N. vaccinii* ІМВ В-7405 є облігатними аеробами, що вимагає постійної аерації середовища в процесі культивування

Отже для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 обираємо періодичне глибинне культивування з постійною подачею аераційного повітря.

Для глибинного культивування мікроорганізмів в промислових масштабах використовують ферментатори.

Ферментер для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 повинен бути оснащений барботером для подачі стерильного повітря. Відомо, що кисень погано розчиняється у воді, отже потрібно встановити перемішувачий пристрій, який буде полегшувати доступність кисню для клітин.

При виборі мішалки слід зважати на морфолого-культуральні особливості продуцента. Оскільки штам ІМВ В-7405 відноситься до ряду актинобактерій, то клітини здатні до утворення псевдоміцелію на ранніх етапах росту. Проте за умови росту продуцента на гліцерині псевдоміцелій не виявлено, отже можна обирати звичайну лопатеву мішалку.

Замовити обраний ферментатор для промислового біосинтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 можна у компанії ПромВіт [[https://promvit.com.ua/fermentatory/?gclid=EAIaIQobChMI8LqkiorY4QIVnsmyCh1w9gzQEAAAYASAAEgK\\_IfD\\_BwE](https://promvit.com.ua/fermentatory/?gclid=EAIaIQobChMI8LqkiorY4QIVnsmyCh1w9gzQEAAAYASAAEgK_IfD_BwE)].

При культивуванні мікроорганізмів слід ретельно стежити на всіма показниками середовища в середині ферментатора. Отже необхідно забезпечити наявність датчика температури і рН

#### 4.4.2. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікувальних засобів

Для культивування аеробного штаму актинобактерій *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 оптимальними умовами росту є температура 26-28 °С, значення рН середовища в межах 6,0-7,0. Такі умови є сприятливими для розвитку багатьох інших нейтрофільних і мезофільних мікроорганізмів, тому обираємо асептичний спосіб культивування.

Виробництво препаратів ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 здійснюють впродовж 30 робочих днів. Виробництво включає підготовку такого обладнання: ферментер, інокулятори, реактори для підготовки та стерилізації поживного середовища, збірники для зберігання технічного гліцерину, запасний ферментер та інокулятор, качалки, а також інше обладнання (в тому числі бокс та лабораторне устаткування). Габаритні розміри основного обладнання наведено у табл. 2.1.

Для виготовлення обладнання, вказаного в табл. 2.1 обираємо фірму BIORUS (<https://bio-rus.ru/>), яка виготовляє будь-яке обладнання, призначене для біотехнологічних виробництв під замовлення із заданим об'ємом. На сайті фірми зазначено, що обладнання виготовляють у співвідношенні висота : діаметр (h:d) 1:2, тому в табл. 2.1 наведені ферментер, інокулятори і збірники саме з такими геометричними розмірами.

Таблиця 4.6

**Габарити обладнання для виробництва культуральної рідини *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Обладнання		Геометричний об'єм, л	Діаметр, мм	Висота, мм
Виробничий біосинтез	Ферментер	1500	985	1970
	Реактор-змішувач композиції А	1500	985	1970
	Збірник для технічного гліцерину	20	24	47
Інокулятор 1	Інокулятор	150	45,8	91,6

	Реактор-змішувач композиції А	150	45,8	91,6
<b>Інокулятор 2</b>	Інокулятор	15	21,2	42,4
	Реактор-змішувач композиції А	15	21,2	42,4
<b>Всього</b>		<b>3400</b>	-	-

Виробництво поділяється на такі цехи: цех виробничого біосинтезу, лабораторне приміщення для проведення різноманітних операцій, де знаходяться автоклави, бокс, термостати, холодильники, а також різноманітні прилади для проведення різних видів контролю та качалочна кімната.

Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер (1500 л), інокулятори (150 і 15 л), збірники, автоклав та інше обладнання становить:  $11 \times 10 = 110 \text{ м}^2$ . Висота стін, що миється – 2,5 м. Загальна площа стін –  $195 \text{ м}^2$ . Площа підлоги –  $110 \text{ м}^2$ .

На рис. 1 наведено приблизний план приміщення для виробництва ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405. Варто зазначити, що при плануванні враховуємо діаметри обладнання, відстань між апаратами (1 м), а також розміщення апаратів від стін на відстані 1,5 м.

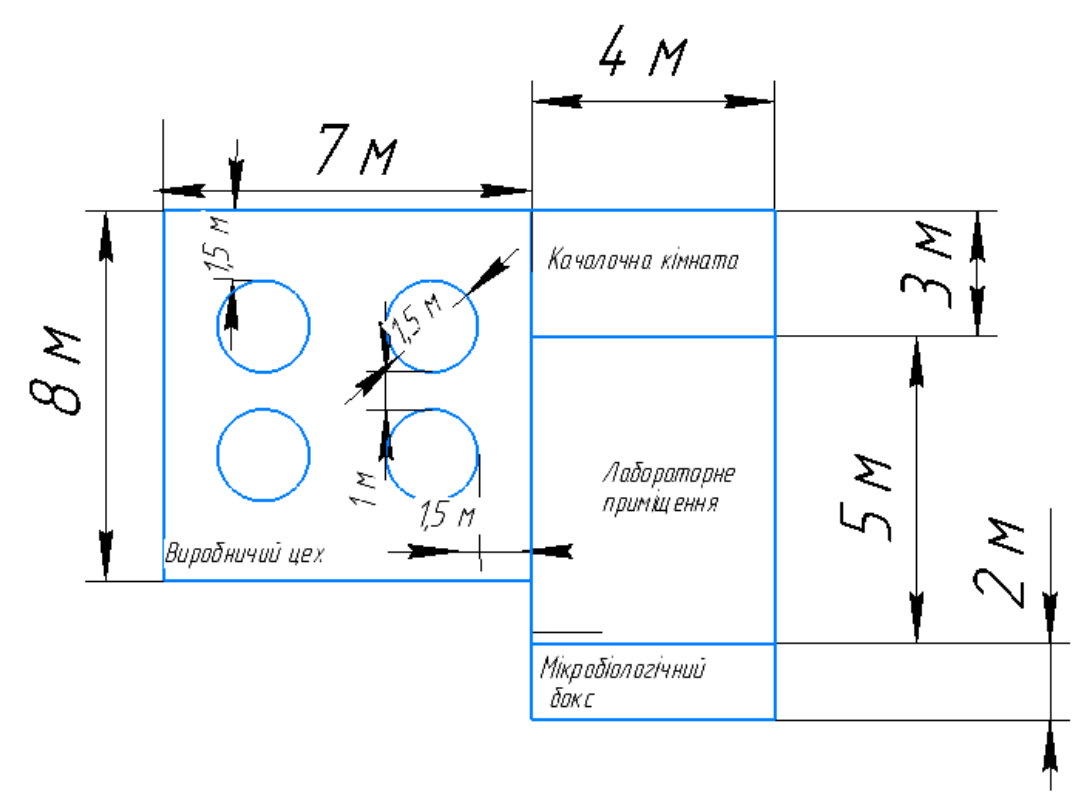


Рис.4 Загальна схема підприємства виробництва ПАР *Nocardia vaccinii*  
ІМВ В-7405

На основі даного плану та габаритних розмірів обладнання проводимо розрахунок площ кожного цеху та відповідних їм висот стін.

Площа цеху виробничого біосинтезу становить:  $10 \times 7 = 56 \text{ м}^2$ .

Загальна площа лабораторії, качалочної кімнати та боксу становить :

$4 \times 10 = 40 \text{ м}^2$ . (  $20 \text{ м}^2$  – лабораторія,  $12 \text{ м}^2$  – качалочна кімната,  $8 \text{ м}^2$  - бокс)

Звідси, загальна площа виробничого приміщення становить:

$$40 + 56 = 96 \text{ м}^2$$

Необхідно провести також розрахунок площі стін, які будуть митися дезінфікуючими розчинами. Враховуємо, що висота стін, які будуть митися становить 2,5 м, тоді загальна площа стін для миття становитиме:

$$\text{Виробничий цех: } ((7 \times 2,5) + (8 \times 2,5)) \times 2 = 85 \text{ м}^2$$

$$\text{Качалочна кімната: } ((3 \times 2,5) + (4 \times 2,5)) \times 2 = 35 \text{ м}^2$$

$$\text{Бокс: } ((2 \times 2,5) + (4 \times 2,5)) \times 2 = 30 \text{ м}^2$$

$$\text{Лабораторія: } ((5 \times 2,5) + (4 \times 2,5)) \times 2 = 45 \text{ м}^2$$

В табл. 2.2 наведено площі поверхонь приміщень, які будуть оброблятися мийними засобами

Таблиця 4.7

**Розрахунок загальної площі поверхонь виробничих приміщень для обробки мийними засобами**

Приміщення	Площа підлоги, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>	Загальна площа, м <sup>2</sup>
Цех виробничого біосинтезу	56	85	155
Лабораторія	20	45	65
Приміщення з качалками	12	35	47
Бокс	8	30	38
<b>Загальна площа</b>	<b>110</b>	<b>195</b>	<b>305</b>

Варто зазначити, що миття підлоги здійснюють кожного дня, а генеральне прибирання (миття стін, дверей і вікон) здійснюють 1 раз на місяць.

Також необхідно розрахувати мийно-дезінфікуючі засоби для миття обладнання. Загальний об'єм обладнання становить 3,4 м<sup>3</sup> (табл.2.1), Враховуючи, що миття обладнання здійснюють перед кожним циклом (10 циклів) і додаткове миття після останнього циклу ферментації, загальний об'єм миття обладнання становитиме :  $3,4 \times 11 = 37,4 \text{ м}^3$

В табл. 2.3 наведені узагальнені дані щодо миття поверхонь, обладнання під час всього періоду виробництва.

**Розрахунок загальної площі, яка буде піддаватись обробці мийно-дезінфікуючими засобами під час виробництва ПАР *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання	3,4	11	37,4
Підлога	110	30	3 300
Стіни, двері, вікна	195	1	195

**Обґрунтування вибору мийно-дезінфікуючих засобів для обробки обладнання та приміщень при культивуванні *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405**

Під час вибору мийних та дезінфікуючих засобів необхідно зважати на їх ефективність і вартість, а також на витрати для обробки потрібної площі/об'єму. Зазвичай, для обробки 1 м<sup>2</sup> поверхні витрачається 100 мл розчину мийного або дезінфікуючого засобу.

Ємнісне обладнання миють за допомогою СІП-мийки. Витрати робочого розчину складають 20% від об'єму обладнання, що миється. Отже, для миття та дезінфекції 37,4 м<sup>3</sup> обладнання необхідно витратити:

$$37,4 \times 0,2 = 7,48 \text{ м}^3 \text{ засобу в рік}$$

Варто зазначити, що ферментер і збірник об'ємом 1,5 м<sup>3</sup> тримається на валах, тому для зручності їх обслуговування необхідно передбачити майданчик, де буде місце для знятих кришок ферментера і збірника. Площа майданчика буде рівною площі цеху виробничого біосинтезу (70 м<sup>2</sup>), даний майданчик також потребує миття кожного дня під час процесу виробництва ПАР (30 днів), отже загальна площа миття майданчика:  $70 \times 30 = 2\,100 \text{ м}^2$ , її необхідно врахувати при подальших розрахунках мийних засобів.

Тоді, загальна площа миття підлоги, стін, вікон та дверей становить:

$$3\,300 + 195 + 2\,100 = 5\,595 \text{ м}^2$$

В *табл. 4.9* наведені мийно-дезінфікуючі засоби, їх вартість та витрати на виробництво ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

Таблиця 4.9

Узагальнена характеристика витрат мийно-дезінфікуючих засобів під час культивування *Nocardia vaccinii* IMB В-7405

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода <sup>1</sup>	Обладнання	2,0	37,4	7 480	18,75	0,375	2 805
Саніфект <sup>2</sup>	Обладнання	0,2	37,4	7 480	330	0,66	4 936,8
Вімол <sup>1</sup>	Обладнання	1,0	37,4	7 480	23	0,23	1 720,4
Гембар <sup>3</sup>	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	5 595	559,5	420	2,1	1 174,95
Новохлор-екстра <sup>2</sup>	Стіни, підлога, вікна, двері	0,3	5 595	559,5	60	0,18	100,71
ДЕЗЕКОН <sup>1</sup>	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	5 595	559,5	252	1,26	704,97

Ціни наведено станом на жовтень 2019 року: 1-<https://prom.ua>

2- <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-saniffekt-interdez-kiev>

3-[https://eko-him.com.ua/products/7002\\_sredstvo\\_dezinficiruyushhee\\_gembar\\_11](https://eko-him.com.ua/products/7002_sredstvo_dezinficiruyushhee_gembar_11)

Спираючись на дані, наведені в табл.2.4 обираємо мийний засіб для обробки обладнання – «Вімол», а для обробки стін, вікон, дверей та підлоги – «Новохлор-екстра», оскільки вони характеризуються низькою вартістю і високою ефективністю при застосування (див. далі)

**«Вімол»** - технічний миючий засіб у вигляді слабколужного порошку. Містить суміш солей, неорганічних кислот і поверхнево-активних речовин, які забезпечують ефективну дію. Застосування: для механічного способу мийки шляхом рециркуляції його розчинів, а також вручну, шляхом занурення деталей обладнання та інвентаря в робочий розчин препарату. Застосовують для миття обладнання з алюмінію, нержавіючої сталі, синтетичних матеріалів, скла, а також обладнання, вкритого емаллю. [66]. Ефективний проти грампозитивних та грамнегативних вегетативних бактерій, грибів, ліпофільних вірусів.

Зберігають в закритих сухих провітрюваних приміщеннях в первинній упаковці. Температура зберігання -  $-10...+40^{\circ}\text{C}$  при відносній вологості повітря не більше 85%, захищаючи від прямої дії сонячних променів [67].

**«Новохлор-екстра»** - універсальний рідкий лужний дезінфікуючий засіб на основі гіпохлориду натрію і комплексу допоміжних функціональних компонентів. Має широку сферу застосування (дезінфекція, передстерилізаційна очистка, стерилізація, відбілювання).

Ефективний проти багатьох видів мікроорганізмів: грам+ і грам- бактерій (*Pseudomonas aeruginosa*, БГКП, *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, бактерій роду *Proteus*, збудників багатьох хвороб), спорових та пліснявих грибів, вірусів.

Відноситься до III класу небезпеки (помірнонебезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76) [68].

Під час виробництва необхідно забезпечити належну чистоту повітря в приміщеннях. Для цього передбачають наявність бактерицидних УФ-ламп, які використовуються після кожного генерального прибирання ( не рідше 1

разу на тиждень). Під час роботи бактерицидних ламп для безпеки персоналу, в приміщенні не повинно бути людей.

#### **4.4.3. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій**

##### **Миття**

Для миття ємнісного обладнання здійснюють за допомогою циркуляційної СІР-мийки (Cleaning in place) і обраного вище мийно-дезінфікуючого розчину «Вімол».

##### **Стадія технічного огляду**

Після здійснення миття та ополіскування ємнісного обладнання необхідно провести технічний огляд для виявлення можливих поломок, недоліків комунікацій, запірної арматури та інших складових обладнання. У разі їх знаходження негайно проводять виправлення всіх помилок.

##### **Перевірка на герметичність**

Для цього на всьому обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату протягом часу витримки (30-60 хв), отримані дані занотовують в операційному журналі. Апарат вважають герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, в іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість леткої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції становить 1,5-2 год. При виявленні неущільнень терміново здійснюють їх ліквідацію.

##### **Стерилізація обладнання та комунікацій**

*Нагрів апарата.* Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80-90 °С.

*Стерилізація.* Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарата. При досягненні в апараті температури стерилізації 130-135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,2 МПа). Також при стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря ( див. далі).

*Охолодження.* Закривають усю запірну арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подають холодну воду. Для компенсації падіння тиску в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження триває приблизно 3,5 год. до досягнення температури 30-40 °С і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа.

#### **4.4.4. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря**

Відомо, що *N. vaccinii* ІМВ В-7405 є строгим аеробом, тому необхідною є підготовка стерильного аераційного повітря для культивування даного мікроорганізму.

Для стерилізації повітря в боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи.

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітря забірником у найвищій точці  $H \sim 10$  м.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності). Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному

колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється приблизно 95% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів.

#### **4.4.5 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища**

Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 проводять у поживному середовищі наступного складу (г/л):

- NaNO<sub>3</sub> – 0,5;
- MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,1;
- CaCl<sub>2</sub>×2 H<sub>2</sub>O – 0,1;
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,1;
- FeSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O – 0,001,
- дріжджовий автолізат – 0.25

Джерело вуглецю – очищений гліцерин ( 2% об'ємна частка)

#### **Підготовка і стерилізація запасних розчинів**

Оскільки під час вирощування інокуляту в колбах на качалках і в інокуляторі об'ємом 15 л необхідна дуже мала кількість дріжджового автолізату і феруму сульфату семиводного, то для цих стадій передбачаємо приготування і стерилізацію даних компонентів у вигляді запасних розчинів.

**FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O:** для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в качалочних колбах і в інокуляторі об'ємом 15 л необхідно 0,0021 г і 0,05 г FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O відповідно, його готують як запасний розчин об'ємом 100 мл і стерилізують як звичайну сіль: 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв.

**Дріжджовий автолізат:** готують стандартний 5-% запасний розчин на 100 мл. Необхідно врахувати, що даний компонент є термолабільною речовиною, отже його стерилізують при температурі 112°C, тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

До складу поживного середовища входять солі Ca, Mg, а також фосфатні солі, які разом при підвищених температурах утворюють нерозчинний осад, тому для їх стерилізації в складі однієї композиції необхідно підготувати 6-% розчини NaOH і HCl (див. далі). Відомо, що для підлужнення і підкислення 1 л поживного середовища використовують 2 мл 6-% розчину відповідного реактиву. Розрахунок див. розділ 3

### **Вирощування інокуляту в колбах на качалках**

На даному етапі потрібно приготувати 770 мл поживного середовища (ПС). Оскільки об'єм ПС невеликий, стерилізація його здійснюється в автоклаві. Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *N.vaccinii* IMB B-7405, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

**Композиція А:**  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; (режим стерилізації: температура 131°C, тиск 0,15 МПа протягом 40 хв)

**Композиція Б:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; (режим стерилізації: 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв). Дана сіль стерилізується окремо від інших, оскільки залишки фосфатної солі реагують з Ca та Mg, і утворюють нерозчинний осад, що призведе до недоступності хімічних елементів для клітини.

Технічний гліцерин стерилізації не потребує через високий вміст токсичних речовин і високу в'язкість, що запобігає розвитку сторонніх мікроорганізмів, тому його безпосередньо вносять окремо в кожен колбу.

### **Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л**

Для вирощування посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 8,43 л ПС.

Оскільки стерилізація середовища здійснюється безпосередньо в інокуляторі, склад композицій змінюється.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  стерилізується разом з іншими солями. Для запобігання утворенню нерозчинних солей кальцію і магнію з фосфатним залишком значення рН середовища доводять до 4,0-4,5 за допомогою приготованого

розчину 6%-ї HCl. Розчинення солей здійснюють у збірнику з мішалкою і сорочкою.

**Композиція А:** NaNO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ( режим стерилізації: 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв, рН 4,5)

Перед засівом в інокулятор додають FeSO<sub>4</sub> х 7H<sub>2</sub>O, дріжджовий автолізат і гліцерин з засівної колби об'ємом 1 л, після чого доводять рН до 6,8-7,0 за допомогою 6%-го розчину NaOH.

#### **Приготування поживного середовища в інокуляторі об'ємом 150 л**

Необхідно підготувати 75 л ПС. Всі компоненти стерилізують в посівному апараті. Розчинення солей відбувається в збірнику об'ємом 500 л. Оскільки на даному етапі для підготовки та стерилізації ПС використовують 0,244 г FeSO<sub>4</sub> х 7H<sub>2</sub>O (можна зважити), то для полегшення роботи, дану сіль ми додаємо в композицію А.

Для стерилізації солей рН доводять до 4,5-5,0 за допомогою 6%-го розчину HCl.

**Композиція А:** NaNO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> х 7H<sub>2</sub>O; ( режим стерилізації: 131°C, 0,15 МПа протягом 40 хв, рН 4,0-4,5)

**Композиція Б:** дріжджовий автолізат стерилізують збірнику об'ємом 1 л при температурі 112°C, тиску 0,05 МПа протягом 30 хв

Перед засівом в інокулятор додають FeSO<sub>4</sub> х 7H<sub>2</sub>O, дріжджовий автолізат і гліцерин, після чого доводять рН до 6,8-7,0 за допомогою 6%-го розчину NaOH.

#### **Приготування поживного середовища для біосинтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВВ-7405 в ферментері об'ємом 1500 л**

На цьому етапі потрібно приготувати 760 л поживного середовища. Розчинення солей відбувається у збірнику. Стерилізація проходить в ферментаторі. Перед початком стерилізації значення рН ПС доводять до 4,0-4,5 за допомогою 6%-ї HCl, яку подають з окремого збірника.

**Композиція А:**  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; ( режим стерилізації:  $131^\circ\text{C}$ , 0,15 МПа протягом 40 хв, рН 4,5)

**Композиція Б:** дріжджовий автолізат стерилізують в збірнику об'ємом 10 л при температурі  $112^\circ\text{C}$ , тиску 0,05 МПа протягом 30 хв

Перед засівом в ферментер додають джерело вуглецю зі збірника об'ємом 20 л, рН середовища доводять до 4,0-4,5 за допомогою простерилізованого в 3 л-му збірнику 6%-го розчину  $\text{NaOH}$ .

Отже, процес приготування поживного середовища і інокуляту для культивування *N. vaccinii* IMBV-7405 в ферментаторі об'ємом  $1,5 \text{ м}^3$  включає такі допоміжні роботи:

- 1) Приготування і стерилізація розчинів 6% соляної кислоти і їдкого натру для регуляції значення рН на стадіях приготування 15, 150 і 1500 л поживного середовища;
- 2) Приготування і стерилізація запасних розчинів солі феруму і дріжджового автолізату для вирощування інокуляту в колбах на качалках і в інокуляторі об'ємом 15 л.
- 3) Підготовка та стерилізація композицій поживного середовища;

Також необхідно передбачити підготовку збірників, в яких готують компоненти середовища, які неможливо включити в склад основних композицій:

- Збірник 3 л з мішалкою і сорочкою для приготування 6%-го розчину їдкого натру;
- Збірник 3 л з мішалкою і сорочкою для приготування 6%-го розчину соляної кислоти;
- Збірники, обладнані сорочкою і мішалкою об'ємом 15, 150 і 1500 л для розчинення солей при підготовці середовища культивування
- збірник об'ємом 20 л для технічного гліцерину
- збірник об'ємом 5 л для приготування дріжджового автолізату

#### 4.5. Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Згідно з ТЕО для забезпечення миття 713 зерноховищ необхідно 4813 л культуральної рідини на рік з концентрацією ПАР 2 г/л. вираховали, що таку кількість культуральної рідини можна насинтезувати за 29 робочих трудоднів.

Концентрація біомаси в культуральній рідині становить 2 г/л, тобто 0,2%, тоді вміст продукту в культуральній рідині  $P_{ст} = 99,8$  об.%. Готовий продукт – це супернатант, тоді  $P_{гн} = 100$  об.%.

Виробничий біосинтез антимікробних ПАР *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 здійснюють на такому поживному середовищі:

- ✓  $NaNO_3$  – 0,5;
- ✓  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,1;
- ✓  $CaCl_2 \times 2 H_2O$  – 0,1;
- ✓  $KH_2PO_4$  – 0,1;
- ✓  $FeSO_4 \times 7 H_2O$  – 0,001,
- ✓ дріжджовий автолізат – 0.25
- ✓ Джерело вуглецю – очищений гліцерин 2% об'ємна частка (25,2 г/л)

$$C\Sigma = 26,3$$

Для подальших розрахунків приймемо:

- час циклу роботи ферментера,  $T_{цф} = 79$  год;
- коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій),  $K_1 = 1,21$ ;
- коефіцієнт заповнення ферментера, частка,  $K_3 = 0,6$
- коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка,  $K_{па} = 0,6$ ;
- коефіцієнт заповнення інокулятора, частка,  $K_{ін} = 0,6$ ;

- коефіцієнт заповнення колб, частка,  $K_{\text{кол}} = 0,2$ ;
- коефіцієнт заповнення збірника, частка,  $K_{\text{зб}} = 0,8$ ;
- сумарні втрати активності при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту), частка,  $E_{\text{св}} = 0,1$ ;
- концентрація посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05-0,1),  $X_{\text{вф}} = 0,1$ ;
- концентрація посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02-0,1),  $X_{\text{па}} = 0,1$ ;
- концентрація посівного матеріалу для інокуляторів, частка,  $X_{\text{ін}} = 0,1$ ;
- концентрація посівного матеріалу для качалочних колб, частка,  $X_{\text{кол}} = 0,1$ ;
- втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка,  $E_{\text{ф}} = 0,1$ ;
- втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка,  $E_{\text{па}} = 0,1$ ;
- втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка,  $E_{\text{ін}} = 0,1$ ;
- втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка,  $E_{\text{кол}} = 0,02$ .

#### 4.5.1. Розрахунок кількості виробничих циклів

1. Кількість продукту що необхідно отримати на добу,  $\text{м}^3$  /добу:

$$V_{\text{нд}} = V_{\text{нт}}/T_{\text{рд}} = 4813 /29 = 0,166$$

2. Кількість продукту що необхідно отримати за цикл,  $\text{м}^3$ /цикл:

$$V_{\text{цк}} = V_{\text{нд}} \times T_{\text{цф}}/24 = 0,166 \times 79/24 = 0,547$$

4. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = V_{\text{нт}}/ V_{\text{цк}} = 4813/0,547 = 8,79 = 9.$$

5. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл),  $\text{м}^3$ :

$$V_{кр} = K_1 \times V_{цк} \times P_{гп} / P_{ст} (1 - E_{св}) = 1,21 \times 0,547 \times 100 / 99,82 (1 - 0,1) = 0,751.$$

6. Вихід продукту з 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини, л/м<sup>3</sup>:

$$q_{ац} = V_{цк} \times 1000 / V_{кр} = 0,547 \times 1000 / 0,751 = 728,36$$

#### 4.5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

3.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

1) Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері до культивування становить:

$$V_{роб1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{751}{1 - 0,1} \approx 834,4 = 835 \text{ л}$$

2) Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб1}}{1 + X_{ф}} = \frac{835}{1 + 0,1} \approx 759,1 = 760 \text{ л}$$

3) Необхідна кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 835 - 760 = 75 \text{ л}$$

Коефіцієнт заповнення для виробництва 835 л культуральної рідини: при обраному коефіцієнті заповнення  $K_3 = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{ф.1} = 835 / 0,6 = 1391,7 \text{ л}$ . Для зручності обираємо ферментер з геометричним об'ємом 1,5 м<sup>3</sup>.

3.2.2. Визначення кількості стадій вирощування посівного матеріалу

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища ( $X_{ф} = X_1 = X_{колб} = 10\%$ ).

Щоб отримати 75 л посівного матеріалу, розраховуємо необхідну кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (враховуємо втрати, що спричинені краплевиносом через колектор відпрацьованого повітря):

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1 - E_{ін}} = \frac{75}{1 - 0,1} = 83,4 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{83,4}{1 + 0,1} = 75,82 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для даного інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 83,4 - 75,82 = 7,58 \text{ л}$$

Щоб отримати 7,58 л посівного матеріалу необхідно як і в попередніх етапах врахувати втрати, які виникають в результаті краплевиносу (10%)

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{7,58}{1 - 0,1} = 8,43 \text{ л}$$

Кількість ПС в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{8,43}{1 + 0,1} = 7,67 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість посівного матеріалу для вирощування 7,58 л посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 8,43 - 7,67 = 0,76 \text{ л}$$

0,76 л інокуляту (760 мл) у виробничих умовах можна отримати вирощуючи ПМ в колбах на качалках. Використовують колби об'ємом 750 мл які заповнюють 150 мл ПС.

Розраховуємо необхідну кількість інокуляту з урахуванням втрат ( $E_{\text{колб}} = 0,01\%$ ):

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - E_{\text{колб}}} = \frac{0,76}{1 - 0,01} = 0,77 \text{ л} = 770 \text{ мл.}$$

Далі потрібно розрахувати кількість колб для вирощування 770 мл інокуляту:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{770}{750 \times 0,2} = 5,1 = 6 \text{ колб}$$

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу ПАР проходить в 3 стадії.

### 4.5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 5 м<sup>3</sup>

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}}$ , при заповненні ферментера на **0,835 м<sup>3</sup>**.

$$G_{\text{заг}} = 0,835 \times C_{\Sigma} = 0,835 \times 26,3 = 21,96 \text{ кг, в тому числі покомпонентно,}$$

Г:

$$\text{Гліцерин - } G_1 = G_{\text{заг}} (G_1 / C_{\Sigma}) = 21960,5 (25,2/26,3) = 21042;$$

$$\text{NaNO}_3 \text{ - } G_2 = G_{\text{заг}} (G_2 / C_{\Sigma}) = 21960,5 (0,5/26,3) = 417,5;$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O - } G_3 = G_{\text{заг}} (G_3 / C_{\Sigma}) = 21960,5 (0,1/26,3) = 83,5;$$

$$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O - } G_4 = G_{\text{заг}} (G_4 / C_{\Sigma}) = 21960,5 (0,1/26,3) = 83,5;$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ - } G_5 = G_{\text{заг}} (G_5 / C_{\Sigma}) = 21960,5 (0,1/26,3) = 83,5;$$

$$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O - } G_6 = G_{\text{заг}} (G_6 / C_{\Sigma}) = 21960,5 (0,001/26,3) = 0,835;$$

$$\text{дріжджовий автолізат - } G_7 = G_{\text{заг}} (G_7 / C_{\Sigma}) = 21960,5 (0,25/26,3) = 208,75;$$

Далі необхідно розрахувати кількість води для підготовки різних композицій середовища. Врахуємо, що гліцерин – рідка в'язка речовина, яка не потребує додавання води. Розрахували, що для приготування поживного середовища на виробничий біосинтез необхідно використати 21,042 кг гліцерину. Густина гліцерину – 1,261 кг/м<sup>3</sup>, тоді об'єм гліцерину, який піде на поживне середовище буде становити:  $21,042/1,261 = 16,69$  л поживного середовища яке не потрібно стерилізувати.

Отже, об'єм поживного середовища, для якого необхідно використати воду становить:

$$760 - 16,69 = 743,31 \text{ л}$$

Інші композиції середовища стерилізуються в ферментері, або в реакторі-змішувачі при подачі гострої пари безпосередньо в середовище, або в сорочку реактора. У випадку подачі гострої пари утворюється конденсат, що складає 10% від об'єму стерилізованої композиції:

$$V_{\text{к}} = 743,31 \times 0,1 = 74,331 \text{ л.}$$

Розраховуємо загальну кількість води, яка необхідна на розбавлення компонентів поживного середовища ( $G_{\text{заг}} = 21,96 - 21,042 = 0,918$  л) вона буде становити:

$$V_{\text{в}} = 743,31 - G_{\text{заг}} - (V_{\text{пс}} K_{\text{кон}}) = 743,31 - 0,918 - (743,31 \times 0,1) = 668,061$$

л.

Отже, 668,061 л води необхідно розподілити між двома композиціями: Композиція А (солі), та Композиція Б – дріжджовий автолізат, який є термолабільною речовиною. Зазвичай дріжджовий автолізат стерилізують з розрахунком 5 г автолізату розчиняють у 100 мл води. Отже, розраховуємо необхідну для стерилізації дріжджового автолізату воду:

$$5 \text{ г} - 100 \text{ мл}$$

$$208,75 - X \text{ мл}$$

$$X = 4170 \text{ мл, або } 4,17 \text{ л води}$$

Тоді, для приготування Композиції А необхідно використати:

$$668,061 - 4,17 = 663,891 \text{ л води}$$

Зазначимо, що Композиція А стерилізується безпосередньо в ферментері, а для Композиції Б необхідно передбачити додатковий реактор-змішувач.

Таблиця 4.10

**Склад композицій поживного середовища для виробничого культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л
Гліцерин	25,2	16 690	Не в складі композиції	16,69
NaNO <sub>3</sub>	0,5	417,5	А	738,6
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1	83,5		
CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,1	83,5		
КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	83,5		
FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0,001	0,835		

Вода		663 891		
Конденсат		73 914		
дріжджовий автолізат	0,25	208,75	Б	4,8
Вода		4 170		
конденсат		417		
<b>Разом</b>		<b>760 047</b>		<b>760, 09</b>

Варто зазначити, що Композиція А містить в своєму складі солі фосфору, а також кальцієві і магнієві солі, які при підвищених температурах утворюють нерозчинний осад. Для запобігання цього, перед стерилізацією у ферментер додають 6%-ву соляну кислоту до рН = 4,0-4,5 з розрахунку 2 мл кислоти на 1 літр поживного середовища. Отже, на 760 л поживного середовища використовують:  $738,6 \times 2 = 1,48$  л соляної кислоти.

Після стерилізації середовище необхідно відновити до нормального рН за допомогою 6%-го розчину їдкого натру ( 2 мл розчину на 1 л середовища):  $760 \times 2 = 1,52$  л їдкого натру.

#### **4.5..4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 150 л.**

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для інокулятора об'ємом 150 л загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{пс}$ , при заповненні ферментера на 75 л. Враховуємо, що для вирощування посівного матеріалу кількість гліцерину зменшується до 0,5 % об, тоді загальна кількість поживного середовища становить 7,45 г/л

$$G_{\text{заг}} = 75 \times C_{\Sigma} = 75 \times 7,45 = 558,75 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Гліцерин - } G_1 = G_{\text{заг}} (G_1 / C_{\Sigma}) = 558,75 (6,3 / 7,45) = 472,5;$$

$$\text{NaNO}_3 - G_2 = G_{\text{заг}} (G_2 / C_{\Sigma}) = 558,75 (0,5 / 7,45) = 37,5;$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - G_3 = G_{\text{заг}} (G_3 / C_{\Sigma}) = 558,75 (0,1 / 7,45) = 7,5;$$

$$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{заг}} (G_4 / C_{\Sigma}) = 558,75 (0,1 / 7,45) = 7,5;$$

$$\begin{aligned} \text{KH}_2\text{PO}_4 - & \quad G_5 = G_{\text{заг}} (G_5 / C_{\Sigma}) = 558,75 (0,1/7,45) = 7,5; \\ \text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O} - & \quad G_6 = G_{\text{заг}} (G_6 / C_{\Sigma}) = 558,75 (0,001/7,45) = 0,075; \\ \text{дріжджовий автолізат} - & \quad G_7 = G_{\text{заг}} (G_7 / C_{\Sigma}) = 558,75 (0,25/7,45) = 18,75; \end{aligned}$$

$$\text{Об'єм гліцерину становить: } 472,5/1,261 = 374,7 \text{ мл}$$

Отже, об'єм поживного середовища, для якого необхідно використати воду становить:

$$75 - 0,375 = 74,625 \text{ л}$$

Інші композиції середовища стерилізуються так само як і для виробничого біосинтезу в інокуляторі або в реакторі-змішувачі при подачі гострої пари безпосередньо в середовище, або в сорочку реактора. Розраховуємо кількість конденсату:

$$V_{\text{к}} = 74,625 \times 0,1 = 7,463 \text{ л.}$$

Розраховуємо загальну кількість води, яка необхідна на розбавлення компонентів поживного середовища ( $G_{\text{заг}} = 558,75 - 472,5 = 0,08625\text{л}$ ) вона буде становити:

$$\begin{aligned} V_{\text{в}} &= 74,625 - G_{\text{заг}} - (V_{\text{пс}} K_{\text{кон}}) = 74,625 - 0,08625 - (74,625 \times 0,1) = 67,076 \\ &= 67,1 \text{ л.} \end{aligned}$$

Отже, 67,1 л води необхідно розподілити між двома композиціями: Композиція А та Композиція Б (склад композицій залишається незмінним). Розраховуємо необхідну для стерилізації дріжджового автолізату воду:

$$5 \text{ г} - 100 \text{ мл}$$

$$18,75 - X \text{ мл}$$

$$X = 375 \text{ мл води}$$

Тоді, для приготування Композиції А необхідно використати:

$$67,1 - 0,375 = 66,725 \text{ л води}$$

**Склад композицій поживного середовища для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 в інокуляторі об'ємом 150 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л (мл)
Гліцерин	6,3	374,1	Не в складі композиції	374,1 мл
NaNO <sub>3</sub>	0,5	37,5	А	74,216 л
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1	7,5		
CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,1	7,5		
КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	7,5		
FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0,001	0,075		
Вода		66725		
Конденсат		7425,5		
дріжджовий автолізат	0,25	18,75	Б	431,25 мл
Вода		375		
конденсат		37,5		
<b>Разом</b>		<b>75 015</b>		<b>75,02</b>

Для запобігання утворення нерозчинного осаду фосфорних солей, перед стерилізацією в інокулятор додають 6%-ву соляну кислоту до рН = 4,0-4,5 з розрахунку 2 мл кислоти на 1 літр поживного середовища. Отже, на 75 л поживного середовища використовують:  $74,216 \times 2 = 148,4$  мл соляної кислоти.

Після стерилізації середовище відновлюють до нормального рН за допомогою 6%-го розчину їдкого натру (2 мл розчину на 1 л середовища):  $75 \times 2 = 150$  мл їдкого натру.

#### 4.5.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 15 л.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для інокулятора об'ємом 15 л загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}}$ , при заповненні ферментера на **7,67 л**. Загальна кількість поживного середовища становить 7,45 г/л

$$G_{\text{заг}} = 75 \times C_{\Sigma} = 7,67 \times 7,45 = 57,15 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Гліцерин - } G_1 = G_{\text{заг}} (G_1 / C_{\Sigma}) = 57,15 (6,3 / 7,45) = 48,32;$$

$$\text{NaNO}_3 - G_2 = G_{\text{заг}} (G_2 / C_{\Sigma}) = 57,15 (0,5 / 7,45) = 3,84;$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - G_3 = G_{\text{заг}} (G_3 / C_{\Sigma}) = 57,15 (0,1 / 7,45) = 0,77;$$

$$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{заг}} (G_4 / C_{\Sigma}) = 57,15 (0,1 / 7,45) = 0,77;$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 - G_5 = G_{\text{заг}} (G_5 / C_{\Sigma}) = 57,15 (0,1 / 7,45) = 0,77;$$

$$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - G_6 = G_{\text{заг}} (G_6 / C_{\Sigma}) = 57,15 (0,001 / 7,45) = 0,0077;$$

$$\text{дріжджовий автолізат} - G_7 = G_{\text{заг}} (G_7 / C_{\Sigma}) = 57,15 (0,25 / 7,45) = 1,92;$$

$$\text{Об'єм гліцерину становить: } 48,32 / 1,261 = 38,4 \text{ мл}$$

Отже, об'єм поживного середовища, для якого необхідно використати воду становить:

$$7,67 - 0,0384 = 7,64 \text{ л}$$

Інші композиції середовища стерилізуються так само як і в попередніх випадках в інокуляторі або в реакторі-змішувачі при подачі гострої пари безпосередньо в середовище, або в сорочку реактора. Розраховуємо кількість конденсату:

$$V_{\text{к}} = 7,64 \times 0,1 = 0,764 \text{ л.}$$

Розраховуємо загальну кількість води, яка необхідна на розбавлення компонентів поживного середовища ( $G_{\text{заг}} = 57,15 - 48,32 = 8,83 \text{ мл} = 0,00838$ )

вона буде становити:

$$V_{\text{в}} = 7,64 - G_{\text{заг}} - (V_{\text{пс}} K_{\text{кон}}) = 7,64 - 0,00838 - (7,64 \times 0,1) = 6,87 = 6,9 \text{ л.}$$

Отже, 6,9 л води необхідно розподілити між двома композиціями: Композиція А та Композиція Б (склад композицій залишається незмінним). Розраховуємо необхідну для стерилізації дріжджового автолізату воду:

$$5 \text{ г} - 100 \text{ мл}$$

$$1,92 - X \text{ мл}$$

$$X = 38,4 \text{ мл води}$$

Оскільки це дуже мізерна кількість води, то ми не готуємо дріжджовий автолізат як окрему композицію, а готуємо 100 мл запасного розчину з 5 г дріжджового автолізату, а його об'єм не вираховуємо з загального об'єму середовища.

Так само з сіллю  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2 \text{ O}$ . 0,0077 г неможливо зважити вручну або на об'ємно-ваговому дозаторі, тому ми готуємо 100 мл запасного розчину з 1 г солі, і його об'єм також не будемо вираховувати з об'єму середовища

Тоді, для приготування Композиції А необхідно використати 6,9 л води

*Таблиця 4.12*

**Склад композицій поживного середовища для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 в інокуляторі об'ємом 15 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л (мл)
Гліцерин	6,3	48,32	Не в складі композиції	38,4 мл
$\text{NaNO}_3$	0,5	3,84	А	7,3
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2 \text{ O}$	0,1	0,77		
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2 \text{ O}$	0,1	0,77		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1	0,77		
Вода		6900		
Конденсат		715,5		
<b>Разом</b>		<b>7,67</b>		<b>7,67</b>

Для запобігання утворення нерозчинного осаду фосфорних солей, перед стерилізацією в інокулятор додають 6%-ву соляну кислоту до рН = 4,0-4,5 з

розрахунку 2 мл кислоти на 1 літр поживного середовища. Отже, на 7,67 л поживного середовища використовують:  $7,3 \times 2 = 14,6$  мл соляної кислоти.

Після стерилізації середовище відновлюють до нормального рН за допомогою 6%-го розчину їдкого натру ( 2 мл розчину на 1 л середовища):  $7,67 \times 2 = 15,34$  мл їдкого натру.

#### **4.5.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.**

Для вирощування 770 мл інокуляту використовуємо 6 качалочних колб. становить Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{770}{1 + 0,1} = 700 \text{ мл}$$

Тоді кількість інокуляту для качалочних колб =  $770 - 700 = 70$  мл.

Згідно з прийнятим складом загальні втрати компонентів на визначений об'єм становлять:

$G_{\text{зар}} = 5,74 \times C_{\Sigma} = 0,77 \times 6,56 = 5,74$  г в тому числі покомпонентно, г:

Гліцерин -  $G_1 = G_{\text{зар}} (G_1 / C_{\Sigma}) = 5,74 (6,3 / 7,45) = 4,86$ ;  
NaNO<sub>3</sub> -  $G_2 = G_{\text{зар}} (G_2 / C_{\Sigma}) = 5,74 (0,5 / 7,45) = 0,39$ ;  
MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub> O -  $G_3 = G_{\text{зар}} (G_3 / C_{\Sigma}) = 5,74 (0,1 / 7,45) = 0,077$ ;  
CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub> O -  $G_4 = G_{\text{зар}} (G_4 / C_{\Sigma}) = 5,74 (0,1 / 7,45) = 0,077$ ;  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -  $G_5 = G_{\text{зар}} (G_5 / C_{\Sigma}) = 5,74 (0,1 / 7,45) = 0,077$ ;  
FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub> O -  $G_6 = G_{\text{зар}} (G_6 / C_{\Sigma}) = 5,74 (0,001 / 7,45) = 0,00077$ ;  
дріжджовий автолізат -  $G_7 = G_{\text{зар}} (G_7 / C_{\Sigma}) = 5,74 (0,25 / 7,45) = 0,2$ ;

Об'єм гліцерину становить:  $4,86 / 1,261 = 3,9$  мл

На даному етапі ми виносимо сіль KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в окрему композицію, оскільки при приготування середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках неможливо підкислити а потім нормалізувати рН для запобігання утворення нерозчинного осаду.

Сіль FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub> O та дріжджовий автолізат так само як і на попередньому етапі готують у вигляді запасних розчинів на 100 мл води, і їх

об'єм не вираховують із загального об'єму поживного середовища. Об'єм гліцерину також мізерний, тому ми нехтуємо ним.

Всі складові середовища стерилізують в колбах в автоклаві, тому утворення конденсату тут не відбувається і ми його також не враховуємо.

Отже, для приготування композиції А та композиції Б необхідно взяти 700 мл води.

Таблиця 4.13

**Склад композицій поживного середовища для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л (мл)
Гліцерин	6,3	3,9	Не в складі композиції	3,9
NaNO <sub>3</sub>	0,5	0,39	А	400
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1	0,077		
CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,1	0,077		
Вода		400		
КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	0,077	Б	300
Вода		300		
<b>Разом</b>		<b>700</b>		<b>700</b>

#### 4.6. Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 4.14

##### Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм <sup>3</sup>	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм <sup>3</sup> .
.	<i>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ</i>			
.1	Гліцерин	0,0039	Нестерильне ПС	0,7
.2	NaNO <sub>3</sub>	0,00039		
.3	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,00007 7		
.4	CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,00007 7		
.5	КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00007 7		
.6	FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0,00000 077		
.7	Дріжджовий автолізат	0,0002		
.8	Вода	0,7		
.9	Всього:	0,7		0,7
	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			

.1	Нестерильне ПС	0,7	Всього:	0,7
	Всього:	0,7	Всього:	0,7
.	<b>ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ</b>			
.1	Стерильне ПС	0,7	Посівний матеріал	0,07
.2	Посівний матеріал	0,07		
.3	Частка втрат	0,02	Посівний матеріал	0,014
	Всього:	0,7	Всього:	0,7
4.	<i>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 15 л</i>			
4.1	Гліцерин	0,04832	Нестерильне ПС	7,67
4.2	NaNO <sub>3</sub>	0,00384		
4.3	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,00077		
4.4	CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,00077		
4.5	КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00077		
4.6	FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0,00000 77		
4.7	Дріжджовий автолізат	0,0002		
4.8	Вода	6,9		
4.9	Конденсат	0,7155		
	Всього:	7,64	Всього:	7,67
	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 15 л</b>			
5.1	Нестерильне ПС	7,3	Стерильне ПС	7,67

5.2	Конденсат	0,37	(втрат немає)	0,0
	Всього:	7,67	Всього:	7,67
6	<b>ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ ОБ'ЄМОМ 15 л</b>			
6.1	Стерильне ПС	7,67	Посівний матеріал	7,67
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	0,77		
6.3	Втрати (частка)	0,1		0,76
	Всього:	8,44	Всього:	8,43
	<i>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 150 л</i>			
.1	Гліцерин	0,3741	Нестерильне ПС	75,0 2
.2	NaNO <sub>3</sub>	0,0375		
.3	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,0075		
.4	CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,0075		
.5	КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0075		
.6	FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0,0000 75		
.7	Дріжджовий автолізат	0,0187 5		
.8	Вода	67,1		
9.	Конденсат	7,42		

	Всього:	75,02	Всього:	75,0 2
.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 150 л			
.1	Нестерильне ПС	67,1	Стерильне ПС	67,1
.2	Конденсат	7,42	(втрат немає)	0,0
	Всього:	75,02	Всього:	75,0 2
.	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ ОБ'ЄМОМ 150 л			
.1	Стерильне ПС	75,02	Посівний матеріал	75,0 2
.2	Посівний матеріал з інокулятора об'ємом 15 л	7,67		
.3	Втрати (частка)	0,1		8,43
	Всього:	83,45	Всього:	83,4 5
0	<i>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА ОБ'ЄМОМ 1,5 м<sup>3</sup></i>			
0,1	Гліцерин	16.69	Нестерильне ПС	760.0 9
0,2	NaNO <sub>3</sub>	0.4175		
0,3	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0.0835		

0.4	CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0.0835		
0.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0835		
0.6	FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0.00083 5		
0.7	Дріжджовий автолізат	0,20875		
0.8	Вода	668,061		
0.9	Конденсат	74,331		
	Всього:	760.047	Всього:	760.0 9
1	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА ОБ'ЄМОМ 1,5 м <sup>3</sup>			
1.1	Нестерильне ПС	668,979	Стерильне ПС	760
1.2	Конденсат	74,331	(втрат немає)	0,0
	Всього:	760	Всього:	760
2.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ			
12.1	Стерильне ПС	760	Культуральна рідина на центрифугування	751,6
12.2	Посівний матеріал з інокулятора 150	75		

	л			
12.3	Втрати (частка)	0,1		83,4
	Всього:	835	Всього:	835

Розрахована кількість культуральної рідини для виробничого біосинтезу = 835 л. ту саму кількість ми отримали в розрахунках матеріального балансу, тому можемо вважати матеріальний баланс вірним.

#### 4.7 Розрахунок технологічного обладнання

##### 4.7.1 Розрахунок кількості виробничих ферментерів

4.7.1.1. враховуючи заданий коефіцієнт заповнення ферментера  $K_{зф} = 0,6$ ,  $m^3$  приблизний геометричний об'єм ферментера для виробничого культивування буде становити:

$$V_{фг} = V_{ф}/K_{зф} = 835/0,6 = 1,392 \text{ м}^3$$

4.7.1.2. Оскільки стандартного ферментера з таким об'ємом не існує, обираємо найближчий за об'ємом ферментер з геометричним робочим об'ємом  $1,5 \text{ м}^3$

$$V_{фт} = 1,5 \text{ м}^3$$

4.7.1.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому  $K_3$ , од.

$N_{фр} = V_{фг}/V_{фт} = 1,392/1,5 = 0,928$ , тобто для виробництва достатньо 1 ферментера з обраним об'ємом  $1,5 \text{ м}^3$

4.7.1.4 Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера, частка,  $K_{зф}$

$$K_{зф} = V_{ф}/V_{фт} \times N_{фг} = 835/1,5 \times 1 = 0,557.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення вкладається в задані рамки  $K_{зф} = 0,5 \dots 0,65$ , то вважаємо обраний ферментер задовольняючим наше виробництво.

##### 4.7.2. Розрахунок кількості інокуляторів

4.7.2.1. При заданому коефіцієнті заповнення інокулятора  $K_{ін} = 0,6$ , приблизний геометричний об'єм інокулятора для вирощування посівного матеріалу на виробничий біосинтез буде становити:

$$V_{\text{ін1г}} = V_{\text{ін1}}/K_{\text{ін}} = 83,4/0,6 = 139 \text{ л}$$

4.7.2.2 Оскільки стандартного інокулятора з таким об'ємом не існує, обираємо найближчий за об'ємом інокулятор з геометричним робочим об'ємом 150 л

$$V_{\text{фт}} = 150 \text{ л}$$

4.7.2.3. Кількість інокуляторів при заданому  $K_{\text{ін}}$ , од.

$N_{\text{ін1р}} = V_{\text{ін1г}}/V_{\text{ін1г}} = 139/150 = 0,93$ , тобто необхідно використати 1 інокулятор об'ємом 150 л

4.7.2.4 Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора, частка,  $K_{\text{ін}}$

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін1}}/V_{\text{ін1г}} \times N_{\text{ін1г}} = 83,4/150 \times 1 = 0,556$$

Уточнений коефіцієнт заповнення вкладається в задані рамки  $K_{\text{зф}} = 0,5 \dots 0,65$ , то вважаємо обраний інокулятор задовольняючим наше виробництво.

4.7.2.5 При заданому коефіцієнті заповнення інокулятора  $K_{\text{ін}} = 0,6$ , приблизний геометричний об'єм інокулятора для вирощування посівного матеріалу для посівного апарата об'ємом 150 л буде становити:

$$V_{\text{ін2г}} = V_{\text{ін2}}/K_{\text{ін}} = 8,43/0,6 = 14,05 \text{ л}$$

4.7.2.6 Оскільки стандартного інокулятора з таким об'ємом не існує, обираємо найближчий за об'ємом інокулятор з геометричним робочим об'ємом 15 л

$$V_{\text{фт}} = 15 \text{ л}$$

4.7.2.7 Кількість інокуляторів при заданому  $K_{\text{ін}}$ , од.

$N_{\text{ін2р}} = V_{\text{ін2г}}/V_{\text{ін2г}} = 14,05/15 = 0,94$ , тобто необхідно використати 1 інокулятор об'ємом 15 л

4.7.2.8 Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера, частка,  $K_{\text{ін}}$

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін2}}/V_{\text{ін2г}} \times N_{\text{ін2г}} = 8,43/15 \times 1 = 0,562$$

Уточнений коефіцієнт заповнення вкладається в задані рамки  $K_{\text{зф}} = 0,5 \dots 0,65$ , то вважаємо обраний інокулятор задовольняючим наше виробництво.

4.7.3. *Розрахунок кількості качалочних колб*

4.7.3.1. при обраному коефіцієнті заповнення колб  $K_{\text{кол}} = 0,2$ :

$$V_{\text{колб}} = V_{\text{кол}}/K_{\text{кол}} = 0,77/0,2 = 3,85 \text{ л}$$

4.7.3.2. Об'єм однієї качалочної колби

$$V_{\text{колб}} = 0,750 \text{ л}$$

4.7.3.3. Кількість качалочних колб при заданому  $K_{\text{ін}}$ , од.

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{колб}}/V_{\text{колб}} = 3,85/0,75 = 5,2 - \text{приймаємо 6 колб}$$

4.7.4. *Розрахунок кількості реакторів-змішувачів на стадії виробничого біосинтезу*

4.7.4.1. Для приготування Композиції А при підготовці поживного середовища для виробничого біосинтезу необхідно підібрати реактор-змішувач з обраним коефіцієнтом заповнення  $K_{зб} = 0,8$

$$V_{\text{Б1Г}} = V_{\text{Б1}}/K_{зб} = 760/0,8 = 950 \text{ л}$$

Обираємо збірник об'ємом 1000 л

$$K_{зр} = V_{\text{Б1}}/V_{\text{рТ}} \times N_{\text{р}} = 760/1000 \times 1 = 0,76$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$ ,

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Б1Г}}/V_{\text{рТ}} = 950/1000 = 0,95, \text{ отже використовуємо 1 реактор.}$$

4.7.4.2. Підбираємо геометричний об'єм збірника для зберігання гліцерину

$$V_{\text{С1Г}} = V_{\text{С1}}/K_{зб} = 16,69/0,8 = 20,86 \text{ л}$$

Обираємо збірник об'ємом  $V_{\text{рТ}} = 20 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення, частка,  $K_{зр}$

$$K_{зр} = V_{\text{С1}}/V_{\text{рТ}} \times N_{\text{р}} = 16,69/20 \times 1 = 0,83$$

Кількість збірників при заданому  $K_{зб}$ ,

$$N_{\text{р}} = V_{\text{С1Г}}/V_{\text{рТ}} = 20,86/20 = 1,04, \text{ використовуємо 1 збірник.}$$

4.7.4.3. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації дріжджового автолізу.

$$V_{\text{А1Г}} = V_{\text{А1}}/K_{зб} = 4,17/0,8 = 5,21 \text{ л}$$

Обираємо реактор об'ємом  $V_{\text{рТ}} = 10 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення, частка,  $K_{зр}$

$$K_{зр} = V_{A1} / V_{рт} \times N_p = 4,17/10 \times 1 = 0,417.$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$ ,

$$N_p = V_{A1r} / V_{рт} = 5,21/10 = 0,512, \text{ використовуємо 1 збірник.}$$

3.4.5.4. Підбираємо геометричний об'єм збірника для приготування 6% розчину HCl. Розрахована кількість HCl 1,48 л, проте готуємо з запасом 2 л.

$$V_{HClr} = V_{HCl} / K_{зб} = 2/0,8 = 2,5 \text{ л}$$

Обираємо збірник об'ємом  $V_{рт} = 3 \text{ л.}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення, частка,  $K_{зр}$

$$K_{зр} = V_{HCl} / V_{рт} \times N_p = 2/3 \times 1 = 0,7$$

Кількість збірників при заданому  $K_{зб}$ ,

$$N_p = V_{HClr} / V_{рт} = 2,5/3 = 0,84, \text{ використовуємо 1 збірник}$$

4.7.4.5. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування 6% розчину NaOH. Розрахована кількість NaOH 1,52 л, проте з запасом готуємо 2 л.

$$V_{NaOHR} = V_{NaOH} / K_{зб} = 2/0,8 = 2,5 \text{ л}$$

Обираємо реактор об'ємом  $V_{рт} = 3 \text{ л.}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення, частка,  $K_{зр}$

$$K_{зр} = V_{NaOH} / V_{рт} \times N_p = 2/3 \times 1 = 0,67$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$ ,

$$N_p = V_{NaOHR} / V_{рт} = 2,5/3 = 0,84, \text{ використовуємо 1 збірник.}$$

4.7.5. *Розрахунок кількості реакторів-змішувачів на стадії вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 л*

4.7.5.1. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$

$$V_{B2r} = V_{B2} / K_{зб} = 84,3/0,8 = 105,4 \text{ л}$$

В 2-му розділі було обрано реактор об'ємом  $V_{рт} = 150 \text{ л.}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення, частка,  $K_{зр}$

$$K_{зр} = V_{Б2} / V_{рт} \times N_p = 84,3 / 150 \times 1 = 0,562$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$ ,

$$N_p = V_{Б1г} / V_{рт} = 105,4 / 150 = 0,703, \text{ використовуємо 1 реактор-змішувач.}$$

4.7.5.2. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації дріжджового автолізу, розчинів титрувальних агентів NaOH і HCl

Оскільки об'єм для стерилізації становить трохи більше 400 мл, такий об'єм можна приготувати в засівній колбі і простерилізувати в автоклаві для зменшення витрат виробництва на купівлю дороговартісних збірників. Так само і титрувальні агенти будемо готувати і стерилізувати в засівних колбах. Гліцерин не стерилізується, але подаватись до інокулятора також буде через засівну колбу.

4.7.6. *Розрахунок кількості реакторів-змішувачів на стадії вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л*

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування Композиції А на стадії підготовки посівного матеріалу в інокуляторі 15 л.

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$

$$V_{Б2г} = V_{Б3} / K_{зб} = 7,67 / 0,8 = 7,58 \text{ л}$$

Обираємо реактор об'ємом  $V_{рт} = 10 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення, частка,  $K_{зр}$

$$K_{зр} = V_{Б3} / V_{рт} \times N_p = 7,67 / 10 \times 1 = 0,767$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$ ,

$$N_p = V_{Б3г} / V_{рт} = 7,67 / 7,58 = 1,01, \text{ використовуємо 1 збірник}$$

Варто зазначити, що необхідно забезпечити виробництво запасним ферментером, і кожним з обраних реакторів змішувачів, оскільки у разі поломки або контамінації основного апарата необхідно мати ще один, для того, щоб не припиняти виробництво ПАР і не втрачати час.

Для підготовки та стерилізації компонентів середовища та титрувальних агентів використовуємо засівні колби, що значно скоротить витрати виробництва на дороговартісне обладнання.

#### 4.8. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання, що зображене на апаратурній схемі у графічній частині курсового проекту наведена у табл. 4.1.

Таблиця 4.15

#### Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
З-1	Збірник для промивної води	1	Збірник об'ємом 3200 л, нержавіюча сталь, 1,9м діаметр, 1,65м висота. Виробник: "Е4А" (Росія). <sup>1</sup>
Р-2	Реактор-змішувач для приготування розчину Вімолу	1	Реактор-змішувач об'ємом 3,2 м <sup>3</sup> , оснащений паровою сорочкою та швидкохідним перемішувальним пристроєм нержавіюча сталь Виробник: "Е4А" (Росія). <sup>1</sup>
Д-3	Дозатор	1	Дозатор ваговий ДНД, діапазон зважування від 0,1 до 5 кг, похибка вимірювання 0,05-0,1 кг. Виробник: «Росат» (Росія). <sup>2</sup>
Д-13 Д-17 Д-22 Д-26 Д-28	Ваги технічні електронні	4	Ваги технічні електронні AXIS BD3000/0.1, діапазон зважування від 0,1 г до 3 кг, клас точності IV (ГОСТ 24104-88). Виробник: «AXIS» (Польща) <sup>3</sup>
Д-30	Промисловий дозатор для рідин	1	Електронний промисловий дозатор води та рідин Serv_W21, об'єм дозованої рідини від 1 до 999,9 л, похибка 1-1,5%. Компанія: «ФОП Нікітін О.М.» (Україна). <sup>4</sup>

Н-32	Насос циркуляційний	1	Насос відцентровий Pedrollo 2CP 25-160B. Продуктивність 160 л/год, матеріал Чугун ISO 228/1. Виробник: «Pedrollo» (Італія) <sup>5</sup>
Н-20 Н-16	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий Jet 200. Продуктивність 150 л/год, матеріал нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: «Taifu» (Китай) <sup>6</sup>
ПЗ-5	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник А1И 019.000-01 Повітрозабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». <sup>7</sup>
Ф-6	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G2. Фільтруючий матеріал – синтетичні волокна поліестера, вологостійкість до 100%, термостійкість до 80 °С. Виробник: Компанія «Ліаг Технік Сервіс Україна» <sup>8</sup>
К-7	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). <sup>8</sup>
Т-8	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник водяний Roen Est. Продуктивність від 16,9 до 105,6 кВт. Виробник: Італія. Фірма: «Оллтан» (Україна). <sup>9</sup>
Р-9	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 900-800-11-01. Об'єм 900 л. Робочий тиск 1,1 МПа. Виробник компанія «ZELKO Group» (Україна). <sup>10</sup>
Т-10	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач водяний VENTS НКВ 250-4. Максимальний робочий тиск 1,5 МПа, при температурі 100 град. Виробник Виробник «VENTS» (Росія) <sup>11</sup>
Ф-11	Головний фільтр	1	Фільтр POLITEX AS550G. Фільтруючий матеріал – мікро поліестер та мікро волокно. Швидкість фільтрування 0,25 м/с. Максимальна робоча температура 100 град.. Виробник компанія «General filter» (Італія). <sup>12</sup>
Ф-15 Ф-18 Ф-20 Ф-33	Індивідуальні фільтри	5	Фільтр АМЕ250С. Продуктивність – 200 л/хв, діапазон температур 5-60 °С, ступінь очищення становить 0,01 мкм. Виробник: «АМЕ» (Японія). <sup>13</sup>

Ф-36			
Р-12	Збірник для композиції А	1	Біореактор BioFlo-410 об'ємом 14 л, розміри (см) - 83,8 х 31,8 х 44,5 оснащений сорочкою, мішалкою (50-1000 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: "Eppendorf" (Німеччина) <sup>16</sup>
ІН-14	Інокулятор	1	Інокулятор BioFlo-410 об'ємом 14 л, розміри (см) - 83,8 х 31,8 х 44,5 оснащений сорочкою, барботером, мішалкою (20-500 об/хв), пробовідбірником, контролером температури, рН, сталь AISI 316L. Виробник: "Eppendorf" (Німеччина) <sup>16</sup>
Р-27 Р-29	Реактор-змішувач для HCl, NaOH	2	Реактор-змішувач BioFlo-110 об'ємом 3л, розміри (см) - 29 х 36 х 56, оснащений сорочкою, мішалкою (40-630 об/хв), Контроль рН від 2 до 12 сталь AISI 316L. Виробник: "Eppendorf" (Німеччина) <sup>16</sup>
Р-25	Реактор-змішувач для гліцерину	1	Реактор-змішувач з мішалкою і сорочкою об'ємом 50 л. розміри: висота 0,15 м, діаметр 0,5 м, сталь AISI 316L. Виробник «BioTechno Group» (Росія) <sup>15</sup>
З-18	Збірник для композиції А	1	Збірник об'ємом 130 л, діаметр 0,78 м, висота 1,4 м, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100-450 об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: "E4A" (Росія) <sup>1</sup>
ІН-22	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 150 л, співвідношення висота/діаметр – 3/1, оснащений сорочкою, барботером, мішалкою (30-600 об/хв), пробовідбірником, контролером температури, рН, сталь AISI 316. Виробник компанія «BioTechno Group» (Росія). <sup>15</sup>
Р-31	Збірник для композиції А	1	Збірник об'ємом 1000 л, співвідношення висота/діаметр 3/1, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (20-200 об/хв), сталь 1.4301- AISI 304. Виробник: «BioTechno Group» (Росія). <sup>15</sup>
ФР-34	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 1500 л,

			співвідношення висота/діаметр 2/1, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (10-100 об/хв), пробовідбірником, контролером температури, рН, сталь AISI 316L. Виробник: «ВіоТехно Group» (Росія). <sup>15</sup>
--	--	--	---

**Примітка\*:** пошук і підбір обладнання здійснювали з використанням наступних електронних джерел:

- 1 <https://e4a.ru>
- 2 [http://rosat.ru/mikrodozator\\_neprreryvnogo\\_dejstvija](http://rosat.ru/mikrodozator_neprreryvnogo_dejstvija)
- 3 <https://unipro.com.ua/ua/%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%B8-%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D1%96%D1%87%D0%BD%D1%96-%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D1%96-%D0%B0%D1%85is-bd3000-0-1--%D0%BD%D0%B3%D0%B7--3000-%D0%B3--d-0-1-%D0%B3-https://prom.ua/p491625353-elektronnyj-promyshlennyj-dozator.html>
- 4 <https://f.ua/wilo/star-rs-15-4-130.html>
- 5 <https://nep.ua/nasos-tsentrobezchnyj-pedrollo-2cp-25-160b?search=%D0%BD%D0%B0%D1%81%D0%BE%D1%81%20%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B5%D0%B6%D0%BD%D1%8B%D0%B9http://www.dalgakiran.com.ua>
- 6 <https://prom.ua/p985243888-filtr-gruboj-ochistki.html>
- 7 <https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html>
- 8 <https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery>
- 9 <https://vents.ua/product/nkv-2504>
- 10 <https://www.generalfilter.com/?sp=POLITEX%20AS550G>
- 11 <https://tiu.ru/p182354565-filtr-sverhtonkoj-ochistki.html>
- 12 [http://www.awt.ru/datas/catalogs/data\\_files/fermenters\\_bioreactors.pdf](http://www.awt.ru/datas/catalogs/data_files/fermenters_bioreactors.pdf)
- 13 <https://www.biotechno.ru/catalog/pilotnye-fermentery/pilotnyy-fermenter-biotechno-obemom-150-300-l/>

- 14 <https://www.biotechno.ru/catalog/promyshlennye-fermentery/promyshlenny-fermenter-biotechno-obemom-1000-2000-1/>
- 15 <https://www.biotechno.ru/catalog/emkosti-i-rezervuary/reaktor-s-meshalkoy-50-1/>
- 16 [http://www.awt.ru/datas/catalogs/data\\_files/fermenters\\_bioreactors.pdf](http://www.awt.ru/datas/catalogs/data_files/fermenters_bioreactors.pdf)

#### **4.9. Опис технологічної схеми**

Технологічна схема виробництва антимікробних поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 включає допоміжні роботи: санітарна підготовка персоналу та приміщень, підготовка аераційного повітря, приготування і стерилізація титрувальних агентів, запасних розчинів та поживних середовищ, а також технологічні процеси: зберігання колекційної культури, вирощування посівного матеріалу і біосинтез ПАР, а також знешкодження відходів.

Технологічну схему біосинтезу поверхнево-активних речовин наведено у графічній частині курсового проекту.

##### **ДР 1. Санітарна підготовка виробництва**

##### ***ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів***

##### ***ДР 1.1.1. Приготування розчину засобу «Вімол»***

Робочий розчин «Вімолу» для миття обладнання (концентрація 1%) готують в збірнику перед подачею у СІР-мийку. До збірника об'ємом 3,2 м<sup>3</sup> надходить 1,5 кг порошкового «Вімолу» через об'ємно-ваговий дозатор, після чого через той же дозатор додають 1,5 м<sup>3</sup> питної води. Оптимальна температура робочого розчину для миття обладнання – 75-80 °С, тому збірник оснащений мішалкою та сорочкою для подачі пари. Після повного розчинення порошку (10-15 хв перемішування), отримуємо готовий розчин для миття та дезінфекції обладнання за допомогою СІР-мийки

##### ***ДР 1.2.2. Приготування дезінфікувального розчину «Новохлор-екстра»***

Робочий розчин «Новохлору-екстра» концентрацією 0,3% готуємо безпосередньо перед використанням

В емальовану ємність об'ємом 6-8 л вносять 170 мл концентрованого засобу (перерахунок за хлором) і 5 л води. Для кращого розчинення всіх компонентів мийно-дезінфікуючого засобу додаємо підігріту питну воду (75-80 °С). Після охолодження готового розчину він готовий до використання персоналом. Розчин змінюють на новий через кожні 10 м<sup>2</sup>

### ***ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень***

#### ***ДР 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень***

Щоденне прибирання приміщень (миття підлоги), проводиться кожен день вологим способом. Під час прибирання із всіх приміщень видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва та невикористані матеріали. Відпрацьовані розчини (відпрацьована вода) надходять до стадії знешкодження відходів ( до ЗВ 8.1).

#### ***ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень***

Генеральне прибирання проводять раз на місяць. Для обробки використовують 0,3 % робочий розчин «Новохлору-екстра» (від ДР 1.1.2). Для мікробіологічної очистки повітря після генерального прибирання використовують бактерицидні лампи. Відпрацьовані розчини надходять до стадії знешкодження відходів ( до ЗВ 8.1).

Для контролю чистоти приміщень проводять мікробіологічний аналіз (КУО<300/см<sup>2</sup>).

### ***ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій***

#### ***ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання***

Миття обладнання здійснюється готовим 1%-им розчином «Вімолу» автоматизовано, за допомогою СІР-мийки. Засіб використовують з розрахунку 20% від геометричного об'єму обладнання що миють. Тривалість обробки – 20-25 хв, відпрацьований розчин надходить до ЗВ 8.1. Після миття обладнання робочим розчином «Вімолу» його ополіскують питною водою, яка також надходить до ЗВ 8.1.

### *ДР 1.3.2. Технічний огляд*

Після миття та ополіскування обладнання персонал проводить візуальний технічний огляд для виявлення неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. Для усунення неущільнень підтягують різьбові з'єднання.

### *ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність*

Для цього на всьому обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показники манометра на кришці апарату, час витримки – 30-60 хв. Апарат вважають герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, в іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції становить 1,5-2 год. При виявленні неущільнень терміново здійснюють їх ліквідацію.

### *ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання*

Проходить в 3 етапи.

**Нагрів апарата.** Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають глуху пару і прогривають апарат до температури 80-90 °С.

**Стерилізація.** Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарата. При досягненні в апараті температури стерилізації 130-135 °С закривають усю запірну арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,2 МПа).

**Охолодження.** Закривають усю запірну арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подають холодну воду. Для компенсацій падіння тиску в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження триває приблизно 3,5 год. до досягнення температури 30-40 °С і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа.

#### ***ДР 1.4. Підготовка персоналу***

##### ***ДР 1.4.1 Навчання персоналу***

Весь персонал, що задіяний в будь-якій зоні виробництва, включаючи персонал, що відповідає за тех. огляд і підтримку обладнання має проходити систематичне навчання щодо правильного виробництва продукції, уміння працювати в асептичних умовах, гігієни і основ мікробіології.

##### ***ДР 1.4.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу***

Для миття рук, персонал використовує туалетне або господарське мило, для дезінфекції – 76% етиловий спирт.

#### ***ДР 2. Підготовка аераційного повітря***

##### ***ДР 2.1. Забір атмосферного повітря***

Забір атмосферного повітря здійснюють через повітрозбірник ПЗ 5, встановлений на висоті 10 м.

##### ***ДР 2.2. Попереднє грубе очищення***

Повітря пропускають через фільтр Ф 6 зі скловолокном, де відбувається видалення крупних часток бруду та затримка пилу. Ступінь очистки – 65-75 %.

##### ***ДР 2.3. подача повітря на компресор***

В компресорі К 7 відбувається стиснення повітря до тиску 0,4 МПа, температура повітря - 250°C.

##### ***ДР 2.4. Охолодження і видалення вологи***

Після стиснення повітря збільшується вміст вологи, для видалення зайвої вологи його спочатку охолоджують до 18-19°C у теплообміннику Т 8, далі повітря подають до ресивера Р 9, де видаляють зайву вологу до вмісту  $W=60\%$ .

### ***ДР 2.5. Підігрів повітря***

Для того, щоб на волокнах головного та індивідуальних фільтрів не утворювався конденсат конденсат, повітря підігрівають у теплообміннику-нагрівачі *T 10* до температури 30-35°C.

### ***ДР 2.6. Тонке очищення повітря***

Очищення повітря від мікроорганізмів відбувається в головному фільтрі *Ф 11*. Ступінь очистки – 95 %. Очищене повітря подається до індивідуальних фільтрів.

### ***ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі***

Перед кожним інокулятором і виробничим ферментером, а також перед збірниками, які містять стерильні розчини, встановлені індивідуальні фільтри. Ступінь очистки – 99,999%.

## **ДР 3. Підготовка та стерилізація титрувальних розчинів**

### ***ДР 3.1. Підготовка та стерилізація 6% розчину NaOH***

*ДР 3.1.1. Підготовка та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища в посівному апараті об'ємом 15 л.*

На технічних терезах зважують 0,96 г NaOH і вносять в колбу на 50 мл. Далі в колбу наливають 16 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою, і стерилізують в автоклаві за температури 131°C тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

*ДР 3.1.2. Підготовка та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища в посівному апараті об'ємом 150 л*

На технічних терезах зважують 9,6 г NaOH і вносять в колбу об'ємом 500 мл. Далі в колбу додають 160 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131°C тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

*ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища в ферментаторі об'ємом 1,5 м<sup>3</sup>*

На технічних вагах *Д 28* зважують 96 г натрій гідроксиду і вносять в реактор *Р 29* об'ємом 3 л, додають 1,6 л питної води. Для кращого

розчинення включають мішалку (50-100 об/хв). Після розчинення стерилізують за температури 131°C тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв

### ***ДР 3.2. Підготовка 6% розчину HCl***

*ДР 3.2.1. Підготовка 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 15 л*

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 50 мл вносять 12,8 мл дистильованої води і при перемішуванні додають 3,2 мл 36%-ї хлоридної кислоти. Потрібно дотримуватись саме такої послідовності дій, оскільки при додаванні води в кислоту існує ризик виникнення екзотермічної реакції. Колбу закривають скляною пришліфованою пробкою.

*ДР 3.2.2. Підготовка 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 150 л*

Під витяжною шафою в колбу на 250 мл вносять 128 мл дистильованої і при перемішуванні додають 32 мл 36%-ї HCl Колбу закривають скляною пришліфованою пробкою.

*ДР 3.2.3. Підготовка 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментаторі об'ємом 1,5 м<sup>3</sup>*

В реактор Р 26 оснащений сорочкою та мішалкою об'ємом 2 л подають 1,28 питної води і при перемішуванні вносять 320 мл 36%-ї хлоридної кислоти.

## **ДР 4. Підготовка та стерилізація запасних розчинів**

***ДР 4.1 Приготування і стерилізація запасного розчину заліза II сульфату семиводного***

На технічних вагах зважують 1 г кристалічного  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  і переносять в колбу на 250 мл. Циліндром відміряють і додають 100 мл питної води. Після повного розчинення кристалів солі колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві за температури 131°C тиску 0,15 протягом 40 хв.

***ДР 4.2. Приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу***

На технічних вагах зважують 5 г дріжджового автолізу, переносять в колбу об'ємом 250 мл. Далі в колбу додають 100 мл дистильованої води. Стерилізують в автоклаві за температури 112°C , тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

## **ДР 5. Підготовка та стерилізація поживного середовища**

### ***ДР 5.1. Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці***

На даному етапі необхідно приготувати 700 мл поживного середовища. Оскільки об'єм гліцерину мізерний, ми не вираховуємо його із загального об'єму середовища. Вміст компонентів для приготування середовища на даній стадії наведено в *табл. 5.1*.

#### *ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація компонентів композиції А*

На технічних вагах зважують солі: 0,39 г  $\text{NaNO}_3$ , 0,077 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  і 0,077 г  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ . Наважки переносять в колбу об'ємом 1 л. В колбу додають 400 мл питної води і перемішують до повного розчинення солей. Після розчинення колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію проводять в автоклаві за температури 131°C тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

#### *ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 0,077 г калій фосфату однозаміщеного і поміщають в колбу об'ємом 500 мл. Циліндром відміряють і вносять 300 мл дистильованої води. Перемішують до розчинення солі, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури 131°C тиску 0,15 протягом 40 хв.

**Склад композицій поживного середовища для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л (мл)
Гліцерин	6,3	3,9	Не в складі композиції	3,9
NaNO <sub>3</sub>	0,5	0,39	А	400
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1	0,077		
CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,1	0,077		
Вода		400		
КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	0,077	Б	300
Вода		300		
<b>Разом</b>		<b>700</b>		<b>700</b>

**ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л**

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 7,67 л поживного середовища. При розрахунку кількості води враховуємо об'єм гліцерину і конденсат, що утвориться під час стерилізації. Розрахунок компонентів поживного середовища наведено в *табл. 5.2*

*ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація компонентів композиції А*

На технічних вагах *Д 13* зважують 3,9 г NaNO<sub>3</sub>, 0,77 г MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 0,77 г CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O і 0,8 г КН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Зважені солі поміщають у збірник *Р 12* об'ємом 14 л. через об'ємно-ваговий дозатор подають 6,9 л питної води і включають мішалку ( 50-100 об/хв). Для повного розчинення солей в сорочку збірника подають гостру пару для нагрівання суміші до температури 40 °С. Після розчинення солей, композиція А подається в посівний апарат об'ємом 15 л, де підкислюється 6%-им розчином соляної кислоти ( *Від ДР 3.2.1*) до досягнення значення рН 4,0-4,5. Композицію стерилізують в посівному апараті за температури 131°С тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

**Склад композицій поживного середовища для культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 в інокуляторі об'ємом 15 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л (мл)
Гліцерин	6,3	48,32	Не в складі композиції	38,4 мл
NaNO <sub>3</sub>	0,5	3,84	А	7,3
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1	0,77		
CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,1	0,77		
КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	0,77		
Вода		6900		
Конденсат		715,5		
<b>Разом</b>		<b>7,67</b>		<b>7,67</b>

**ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 150 л**

Для даного етапу необхідно приготувати 75 л поживного середовища. Враховуємо, що 10 % припадає на посівний матеріал, ще 10% - це конденсат, що утвориться під час стерилізації композиції поживного середовища в інокуляторі, також вносимо гліцерин об'ємом 374,1 мл. Розрахунок компонентів поживного середовища наведено в *табл. 5.3*

*ДР. 5.3.1 Приготування і стерилізація компонентів композиції А*

На технічних терезах *Д 17* зважують 37,5 г NaNO<sub>3</sub>, 7,5г MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 7,5г CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 7,5 г КН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> і 0,075 г FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O. Наважки солей вносять у збірник *Р 18* об'ємом 150 л. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв у збірник подають 66,725 л питної води. Для кращого розчинення солей в сорочку збірника подається гостра пара для підігріву суміші до 40 °С. Після розчинення композицію А подають в посівний апарат на 150 л. В апараті значення рН композиції доводять до 4,0-4,5 за допомогою 6%-ї хлоридної

кислоти ( Від ДР 3.2.2). Стерилізують солі в інокуляторі за температури 131°C тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

*ДР. 5.3.2 Приготування і стерилізація компонентів композиції Б*

На технічних вагах зважують 18,75 г дріжджового автолізу. Наважку вносять в колбу об'ємом 1 л, додають 375 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури 112°C тиску 0,05 МПа протягом 30 хв

*Таблиця 4.18*

**Склад композицій поживного середовища для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 в інокуляторі об'ємом 150 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л (мл)
Гліцерин	6,3	374,1	Не в складі композиції	374,1 мл
NaNO <sub>3</sub>	0,5	37,5	А	74,216 л
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1	7,5		
CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,1	7,5		
КН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	7,5		
FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0,001	0,075		
Вода		66725		
Конденсат		7425,5		
дріжджовий автолізат	0,25	18,75	Б	431,25 мл
Вода		375		
конденсат		37,5		
<b>Разом</b>		<b>75000</b>		<b>75</b>

**ДР 2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу ПАР в ферментері об'ємом 1500 л**

Для виробничого біосинтезу ПАР необхідно підготувати 760 л поживного середовища. Враховуємо, що 10% - це конденсат, який утвориться

під час стерилізації. Для приготування 760 л поживного середовища також необхідно внести 16, 69 л гліцерину. Розрахунок компонентів поживного середовища наведено в *табл. 5.4*

*ДР. 5.4.1 Приготування і стерилізація компонентів композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор *Д 30* у збірник *Р 31* об'ємом 1 м<sup>3</sup> вносять 417 г NaNO<sub>3</sub>, 83,5г MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 83,5 г CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 83,5 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> і 0,835 г FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O. При постійному перемішуванні (50-100 об/хв) у збірник подають 738,6 л питної води. Для кращого розчинення солей в сорочку збірника подається пара (40 °С). Після розчинення композицію А подають в ферментер на 1500 л. За допомогою 6%-ї хлоридної кислоти ( Від ДР 3.2.3) рН композиції доводять до значення 4,0-4,5 . Стерилізують солі в ферментері за температури 131°С тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

*ДР. 5.4.2 Приготування і стерилізація компонентів композиції Б*

Через об'ємно-ваговий дозатор *Д 22* в збірник *Р 23* на 3 л подають 208,75 г дріжджового автолізу. При постійному перемішуванні додають 4,17 л питної води. Стерилізують в збірнику за температури 112°С тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

*Таблиця 4.19*

**Склад композицій поживного середовища для виробничого культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму, г(мл)	Композиція	Об'єм композиції, л
Гліцерин	25,2	16 690	Не в складі композиції	16,69
NaNO <sub>3</sub>	0,5	417,5	А	738,6
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1	83,5		
CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O	0,1	83,5		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	83,5		
FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	0,001	0,835		
Вода		663 891		

Конденсат		73 914		
дріжджовий автолізат	0,25	208,75	Б	4,8
Вода		4 170		
конденсат		417		
<b>Разом</b>		<b>760 000</b>		<b>760</b>

## **ТП 6. Підготовка посівного матеріалу**

### ***ТП 6.1. Підтримка колекційної культури***

Колекційна культура *N. vaccinii* IMB В-7405 зберігається в пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі. Пересів здійснюють кожні 2-4 місяці. При роботі з колекційною культурою обов'язково дотримуються умов асептики.

### ***ТП 6.2. Отримання робочої культури на агаризованому середовищі***

Колекційну культуру зі скошеного МПА за допомогою мікробіологічної петлі розсіяти на чашки Петрі з МПА до утворення ізольованих колоній. Бактерії вирощують за температури 30°C протягом 2 днів.

Ізольовані колонії мікробіологічною петлею пересівають в пробірки зі скошеним МПА. Одна колонія використовується для засіву однієї пробірки. Відстань між колоніями в чашці Петрі повинна бути не менше 1 см. Тривалість вирощування складає 1 добу за температури 30°C.

### ***ТП 6.3. Отримання робочої культури на скошеному агаризованому середовищі***

Ізольовані колонії мікробіологічною петлею пересівають в пробірки зі скошеним МПА. Одна колонія використовується для засіву однієї пробірки. Відстань між колоніями в чашці Петрі повинна бути не менше 1 см. Тривалість вирощування складає 1 добу за температури 30°C.

### **ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках**

В колбу з композицією А ( від ДР 5.1.1) вносять композицію Б ( від ДР 5.1.2), додають 0,77 мл запасного розчину  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( від ДР 4.1), 3,9мл запасного розчину дріжджового автолізату ( від ДР 4.2). Далі поживне середовище розливають по 100 мл в качалочні колби об'ємом 750 мл.

В пробірку з робочою культурою *N. vaccinii* ІМВ В-7405, вирощену на скошеному МПА ( від ТП 6.3), вносять по 5 мл стерильної водопровідної води, суспендують клітини, за допомогою стерильної піпетки відбирають одержану суспензію і вносять в колбу з поживним середовищем ( з розрахунку 1 пробірка з робочою культурою на одну качалочну колбу). Всі операції проводять за умов асептики.

Вирощують *N. vaccinii* ІМВ В-7405 в колбах на качалках при 60-220 об/хв, за температури 30°C, впродовж 2 діб.

Після закінчення культивування обов'язково проводять мікробіологічний контроль культуральної рідини з кожної колби, а також визначають концентрацію біомаси 1,1-1,2 г/л.

Після проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу на 1 л.

### **ТП 6.5. Вирощування культури в інокуляторі на 15 л.**

В асептичних умовах в стерильну засівну колбу на 2 л вносять 38,4 мл гліцерину, 20 мл дріжджового автолізату (Від ДР 4.1) і 8 мл  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Від ДР 4.2.)

В посівний апарат з композицією А ( від ДР 5.2.1) подають вміст засівної колби, після чого нейтралізують суміш за допомогою 16 мл 6%-го натрію гідроксиду ( від ДР 3.1.1. ). Потім в апарат вносять посівний матеріал ( від ТП 6.4.)

Культивування проходить за температури 30°C впродовж 48 год.

Кожні 4 години з інокулятора відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси. На 24-ту годину культивування біомаса має становити 0,6-0,8 г/л.

### ***ТП 6.6. Вирощування культури в інокуляторі на 150 л.***

В стерильну засівну колбу об'ємом 2 л вносять композицію Б ( від ДР 5.3.2.), і 374,1 мл гліцерину.

В посівний апарат з композицією А ( від ДР 5.3.1) подають вміст засівної колби, нейтралізують значення рН в посівному апараті, додаючи 6%-й розчин натрію гідроксиду ( від ДР 3.1.2.). Після цього в посівний апарат вносять посівний матеріал ( від ТП 6.5.)

Тривалість культивування становить 48 год., за температури 30°C.

Кожні 4 години з інокулятора відбирається проба культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси. По закінченню культивування біомаса має становити 0,6-0,8 г/л.

### ***ТП 7. Виробничий біосинтез***

Виробниче культивування проходить у ферментері об'ємом 1000 л. в біореактор з композицією А ( від ДР 5.4.1.) за допомогою об'ємно-вагового дозатора подають композицію Б ( від ДР 5.4.2.), 16,69 л гліцерину. Після цього поживне середовище нуйтралізують за допомогою 6%-го натрію гідроксиду ( від ДР 3.1.3. ) і вносять посівний матеріал ( від ТП 6.6.)

Культивування проходить за температури 30°C впродовж 72 год.

Кожні 4 години з інокулятора відбирається проба культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси (2 г/л) і ПАР.

### ***ЗВ 8. Знешкодження відходів***

#### ***ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів***

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1 утилізують, їх направляють на очисні споруди.

#### ***ЗВ 8.2. Знешкодження повітряних відходів***

Відпрацьоване повітря, яке надходить від посівних апаратів та ферментера (від ТП 6.4, ТП 6.5, ТП 6.6 та ТП 7.1) відправляють у системи очищення повітряних відходів.

**4.10. Контроль виробництва комплексного мікробного препарату  
на основі *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Постадійний контроль виробництва ПАР ІМВ В-7405 наведено в табл.

4.20

Таблиця 4.20

**Карта постадійного контролю біосинтезу антимікробних поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405**

Назва стадії та контрольна точка	Що контролюється і що визначається	Метод і засіб контролю	Періодичність контролю	Нормативні значення показника
<b>ДОПОМІЖНІ РОБОТИ</b>				
<b><i>Кх 1.1.1</i></b> Приготування робочого розчину «Вімолу»	Концентрація засобу «Вімол»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 1%
<b><i>Кх 1.1.2</i></b> Приготування робочого розчину «Новохлор-екстра»	Концентрація «Новохлор-екстра»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,3%
<b><i>Км 1.2.1</i></b> Щоденне прибирання виробничих приміщень	Чистота підлоги, чистота обладнання	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після кожного прибирання	Відсутність пилу, забруднення КУО <800/см <sup>2</sup>
<b><i>Км 1.2.2.</i></b> Генеральне прибирання виробничих приміщень	Чистота підлоги, стін, вікон, дверей, обладнання.	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після кожного прибирання	Відсутність пилу, забруднення, КУО <300/см <sup>2</sup>

<b><i>Km 1.3.1</i></b> Миття та ополіскування обладнання	Чистота, концентрація миючого розчину, температура і час миття	Технічний годинник, термометр	Під час здійснення миття	$C = 2\%$ , $t = 75-80^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 1$ год, чистота обладнання
<b><i>Km 1.3.2</i></b> Технічний огляд	Міцність з'єднань	Перевірка з'єднань на міцність	Після миття перед перевіркою на герметичність	Відсутність неущільнень між з'єднаннями
<b><i>Km 1.3.3</i></b> Перевірка на герметичність	Герметичність обладнання, час перевірки	Манометр, технічний годинник	Тиск контролюється протягом всієї перевірки	$P = 0,1-0,2$ МПа, $\tau = 30-60$ хв
<b><i>Km 1.3.4</i></b> Стерилізація обладнання	Тиск і температура, тривалість процесу	Технічний годинник, манометр	Тиск і температура контролюється під час всієї стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $P = 0,5$ МПа, $\tau = 90$ хв
<b><i>Km 2.1</i></b> Забір повітря	Висота забору повітря	Труба для забору	Протягом всього циклу виробництва	$H = 10$ м
<b><i>Km 2.2</i></b> Попереднє грубе очищення	Ступінь очищення повітря після очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	На виході повітря після очищення	$E = 75\%$ , тиск згідно паспорту
<b><i>Km 2.3</i></b> Подача повітря на компресор	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	На виході повітря з компресора	$P = 0,4$ МПа, $t = 250^{\circ}\text{C}$
<b><i>Km 2.4</i></b> Охолодження повітря і видалення вологи	Температура і вологість повітря	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	$t = 18-19^{\circ}\text{C}$ , $W = 60\%$
<b><i>Km 2.5</i></b> Підігрів повітря	Температура повітря	Термометр технічний	Після підігріву повітря	$t = 30-35^{\circ}\text{C}$
<b><i>Km 2.6</i></b> Тонке очищення повітря	Ступінь очищення повітря, перепад тисків, ступінь очищення повітря	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	На виході повітря з фільтру головного очищення	$E = 95\%$ , тиск згідно паспорту

<b><i>Км 2.7</i></b> Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Ступінь очищення повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	На виході повітря з фільтру індивідуального очищення	E = 99,999%
<b><i>Кх, Км, Км 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3</i></b> Приготування стерильного 6% розчину NaOH для посівних апаратів об'ємом 15 та 150 л і ферментера об'ємом 1,5 м <sup>3</sup>	Концентрація NaOH, температура і час стерилізації, стерильність	Хімічний метод, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють під час стерилізації, мікробіологічний метод	C = 6%, t = 131°C, P = 0.15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
<b><i>Кх, Км 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3</i></b> Приготування 6% розчину HCl для посівних апаратів об'ємом 15 та 150 л і ферментера об'ємом 1,5 м <sup>3</sup>	Концентрація HCl, швидкість обертів мішалки	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=6%, w = 50 об/хв
<b><i>Км, Км, Кх 4.1</i></b> Приготування і стерилізація запасного розчину феруму сульфату семиводного	Температура, тиск, час стерилізації, концентрація розчину, відсутність мікробіоти	Годинник технічний, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються постійно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T = 131 °C, C = 1%, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
<b><i>Км, Км, Кх 4.2</i></b> Приготування і стерилізація запасного розчину дріжджового автолізу	Температура, тиск, час стерилізації, концентрація розчину, відсутність мікробіоти	Годинник технічний, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються постійно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T = 112 °C, C = 5 %, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа відсутність мікробіоти
<b><i>Км, Км 5.1.1, 5.2.1, 5.3.1, 5.4.1</i></b> Приготування та	Температура, тиск, час стерилізації, відсутність мікробіоти, рН композиції	Годинник технічний, манометр, мікробіологічний контроль, рН-метр	Температура і тиск визначаються постійно під час стерилізації, рН	t= 131 °C, τ=40 хв, P=0,15 МПа, рН = 4,0-4,5, відсутність

стерилізація композиції А			визначається до та після стерилізації мікробіологічний контроль після стерилізації	мікробіоти
<b>Кт, Км 5.1.2</b> Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Температура, тиск, час стерилізації, відсутність мікробіоти	Годинник технічний, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються постійно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
<b>Кт, Км, Кх 5.3.2, 5.4.2</b> Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 150 л і для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1,5 м <sup>3</sup>	Температура, тиск, час стерилізації, концентрація розчину, відсутність мікробіоти	Годинник технічний, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються постійно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T = 112 °С, С = 5 %, τ = 30 хв, Р = 0,05 МПа відсутність мікробіоти
<b>ТЕХНОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ</b>				
<b>Кт, Км 6.1</b> Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль, температура зберігання	T = 4°С, відсутність сторонньої мікробіоти
<b>Км, Кт 6.2</b> Одержання робочої культури на агаризованому	Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Мікробіологічний контроль, термостат з термометром	Мікробіологічний контроль, температура вирощування	t= 30±2 °С, τ= 24 год, відсутність сторонньої

середовищі				мікробіоти
<b><i>Кт, Км 6.3</i></b> Вирощування робочої культури на скошеному агаризованому середовищі	Температура і час вирощування, мікробіологічна чистота культури	Мікробіологічний контроль, термостат з термометром	Мікробіологічний контроль, температура вирощування	t= 30±2 °С, τ= 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
<b><i>Кт, Км 6.4</i></b> Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Температура і час вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	t= 30±2 °С, τ= 24 год, ω = 60-120 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
<b><i>Кт, Км, Кх 6.5</i></b> Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л	Час і температура вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, рН середовища культивування	Датчик рН годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	t= 30±2 °С, τ= 48 год, рН=6,8-7,0 відсутність сторонньої мікробіоти C <sub>біом.</sub> =0,5-0,6 г/л

<p><b><i>Kт, Км, Кх 6.6</i></b> Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 150 л</p>	<p>Час і температура вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування</p>	<p><math>t = 30 \pm 2</math> °С, <math>\tau = 48</math> год, рН=6,8-7,0 відсутність сторонньої мікробіоти, <math>C_{\text{біом.}} = 0,5-0,6</math> г/л</p>
<p><b><i>Kт, Км, Кх 7.1</i></b> Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1,5 м<sup>3</sup></p>	<p>Час і температура вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси ПАР</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, роторний випарювач</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин, концентрація біомаси і ПАР в кінці культивування</p>	<p><math>t = 30 \pm 2</math> °С, <math>\tau = 120</math> год, рН=6,8-7,0 відсутність сторонньої мікробіоти, <math>C_{\text{біом.}} = 2</math> г/л, <math>C_{\text{ПАР}} = 2</math> г/л</p>

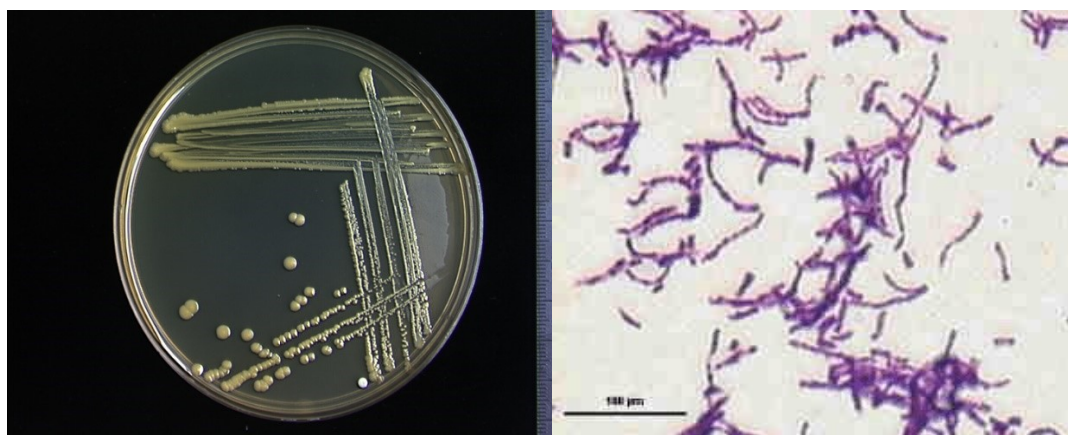
Кожні 8 годин впродовж всього культивування в інокуляторах об'ємом 15 і 150 л, а також в ферментері об'ємом 1,5 м<sup>3</sup> відбирають культуральну рідину для мікробіологічного контролю чистоти продуцента, визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю – гліцерин, і джерела азоту – нітрат натрію. Після закінчення виробничого культивування визначають також вміст ПАР в культуральній рідині.

#### 4.10.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій і з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів і грибів.

При вирощуванні на МПА *N. vaccinii* ІМВ В-7405 утворює складчасті зморшкуваті колонії (3-5 мм) кремово-білого кольору (рис 5.1 (А)) [69].



А

Б

Рис.. Колонії *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на агаризованому середовищі (А), під мікроскопом х90 (Б)

Для мікроскопіювання використовують метод мікроскопіювання з імерсією. На предметне скельце наносять краплю культуральної рідини, висушують над полум'ям пальника, фіксують і розглядають під мікроскопом з об'єктивом 90х, наносячи на препарат краплю гліцерину. Клітини *N.*

*vaccinii* IMB B-7405 мають форму паличок завдовжки 2-6 мкм, можуть розміщуватись окремо, або разом по 4-7 паличок в ланцюжку.( рис 5.1.( Б)) [69].

#### **4.10.2. Визначення показників росту і синтезу**

##### **Концентрація біомаси**

Визначення біомаси проводять ваговим методом після осадження клітин центрифугуванням ( 25 хв при 8000 об/хв). Далі відмиті питною водою клітини висушують, зважують і визначають біомасу.

##### **Концентрація поверхнево-активних речовин**

Відділення клітин *N. vaccinii* IMB B-7405 від культуральної рідини здійснюють центрифугуванням впродовж 25 хв при 8000 об/хв.

Концентрацію ПАР визначають ваговим методом після екстракції їх з супернатанту сумішшю Фолча та випарювання на роторній установці за абсолютного тиску 0,5 атм до постійної маси.

Для екстракції ПАР у циліндричну ділільну воронку об'ємом 100 мл вносять 25 мл супернатанту і 25 мл суміші Фолча (хлороформ і метанол в співвідношенні 2:1), воронку закривають пробкою з пришліфовкою і струшують (для екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають в воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирають (органічний екстракт 1), а водну фазу піддають повторній екстракції, як описано вище. Після розділення фаз зливають нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додають 50 мл суміші Фолча, здійснюють екстракцію, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують і упарюють на роторній випарній установці при температурі 50°C і абсолютному тиску 0,5 атм до постійної маси [61].

##### **Визначення концентрації нітратного азоту**

Визначення концентрації нітратного азоту в супернатанті здійснюють методом високоефективної рідинної хроматографії на приладі Agilent Technologies(США), колонка Anion IC-ПАК™ (50 × 4,6 мм, розмір часток 10

мкм, Waters, Millipore, США). Метод оснований на різному розподілі речовин в динамічних умовах між рухомою і нерухомою фазами.

Швидкість рухомої фази (боратний буфер/концентрату глюконату, метанол, ацетонітрил та деіонізована вода в співвідношенні 2:12:12:74) підтримують на рівні 1,2 мл/хв. Боратний буфер/концентрат глюконату складається з 0,07 М глюконату натрію, 0,3 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,1 М  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  і 3,8 М гліцерину в деіонізованій воді (100 мл). Ін'єкційний обсяг становив 50 мкл.

Для одержання супернатанту культуральну рідину спочатку центрифугують (8000 об/хв протягом 25 хв), далі супернатант фільтрують (діаметр пор 0,22 мкм). [70]

### **Визначення концентрації гліцерину**

Визначення гліцерину проводять методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на приладі Agilent Technologies 1200. Прилад Agilent Technologies 1200 оснащений детектором показника заломлення. Аналіз речовин проводиться зі швидкістю потоку 0,6 мл/хв на колонці Aminex HPLC-87H (300 × 7.8 мм) при температурі 65 °С. Колонка Aminex HPLC-87H заповнена дивінілбензолом, як рухому фазу використовують  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,005 н) [71].

Концентрацію гліцерину визначали в супернатанті ( спосіб отримання супернатанту описано вище)

## РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Технічне завдання для створення схеми автоматизації у вигляді показників які необхідно контролювати наведено в *табл.5.1.*

					НУХТ БТЕК 04.01.01 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акр.шів
Розроб.		Царьова А.М.						138
Перевір.		Пирог Т.П.					121	10
Консультант		Клименко О.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

## Завдання на розробку схеми автоматизації

Місце установки	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
Ферментер	Тиск під час стерилізації	0,15 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Тиск у ферментері	0,03-0,04 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на подачу стисненого повітря
	Температура	30 <sup>0</sup> С	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Величина рН розчину в ферментері	6,0-7,0 од.	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату луку
	Мішалка (оберти)	200 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Підтримка на заданому значенні	Вплив на оберти двигуна
			Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю

### **5.1. Опис функціональної схеми автоматизації**

У першому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати значення тиску в ферментері під час стерилізації, що має регламентоване значення 0,15 МПа. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання тиску передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі пари у апарат (1в).

У другому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати надлишковий тиск в ферментері, який має регламентоване значення 0,03-0,04 МПа. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю». На ПЛК з сигналом від датчика виконуються функція перетворення сигналу в цифрову форму. Після контролера перетворений сигнал від датчика подається на персональний комп'ютер ПК (АРМ оператора–технолога). Для регулювання тиску передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі стисненого повітря у апарат (2в).

У третьому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати температуру культивування, яка має регламентоване значення 30<sup>0</sup>С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок вмикання чи вимикання подачі води у рубашку апарату (3в).

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати значення величини рН в ферментері, який має регламентоване значення 6,0-7,0 од.рН. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Для регулювання значенням величини рН

передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни подачі луку в апарат (4г).

При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М1 відбувається перемішування в речовини в апараті із заданою частотою обертів.

## 5.2. Специфікація засобів автоматизації

Таблиця.5.2

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1а 2а	Тиск	По місцю	Диференційний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, під'єднання – 1/2NPT, клас точності – 0,075, вихідний сигнал аналоговий	PAD	Kobold
1б 2б 3б 4в	Тиск, Температура, рН	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
1в 2в 3в 4г	Тиск, Температура, рН	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20...100 кПа, крутячий момент – 5...30 нм/бар, кут повороту – 90°	KUP	Kobold

3а	Температура	В агрегаті	Датчик термперетворювач опору діапазон (-40 ...+180)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	TSM-100	ООО "ФІРМА КОНТРАГЕНТ, Україна
4а	рН	В агрегаті	рН електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань рН 1...12, максимальна	APS	Kobold

			температура до 80 <sup>0</sup> С, максимальний допустимий тиск 6бар		
46	pH	По місцю	Перетворювач вимірювання pH і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold
KM1	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В	3RT2015- 1AP01	SIEMENS
SA1	Перемикач	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210- 2DA11	SIEMENS
SB1	Перемикач	На щиті	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

## ВИСНОВКИ

1. Під час виконання науково-дослідної роботи встановили, що внесення в середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 дріжджових індукторів (*Candida utilis* БВС-65 та *Candida tropicalis* РЕ-2) індукує синтез поверхнево-активних речовин, біологічні властивості яких (антимікробна активність та здатність руйнувати біоплівки) вищі, ніж властивості ПАР, синтезованих без індукторів.
2. Порівнюючи отримані експериментальні дані з результатами минулорічних експериментів виявили, що дріжджі є більш ефективними індукторами ніж бактеріальні клітини.
3. Серед декількох продуцентів антимікробних ПАР (в тому числі і представників роду *Nocardia*) було обрано найефективніший штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405, зважаючи на швидкість росту (120 год), вартість поживного середовища (0,64 грн/л) а також найдешевшу кінцеву вартість цільового продукту (0,32 грн/г)
4. Аналізуючи сучасні дані щодо аграрного ринку України визначили, що для миття 713 залізних ангарів для зберігання зерне необхідно насинтезувати 48128 л розчину супернатанту з ефективною концентрацією ПАР – 200 мкг/мл
5. Визначили, що необхідну кількість супернатанту можна синтезувати за 29 робочих трудовнів у ферментері об'ємом 1,5 м<sup>3</sup>
6. Розроблено схему автоматизації ділянки виробничого біосинтезу, а також апаратурну і технологічну схеми.
7. Розраховано необхідну кількість збірників для приготування титрувальних агентів, дріжджового автолізу, а також зберігання гліцерину, обладнані датчиками рівня, температури, а в збірниках, де передбачається стерилізація компонентів також встановлено датчик тиску. В свою чергу ферментер, крім датчиків температури, рівня та тиску, обладнаний датчиками регуляції рН та розчиненого в середовищі кисню

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Antimicrobial Resistance [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.who.int/drugresistance/en/>.
2. Буренок О. Чисто, але небезпечно [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.eco.lviv.ua/clean-but-dangerous.html>.
3. Пирог Т. П., Конон А. Д. Мікробні поверхнево-активні речовини. I. Гліколіпіди // *Biotechnol. acta.* – 2013. – Т.7, №1. – С. 9 – 30
4. Пирог Т. П., Никитюк Л. В., Макієнко В. О., Шевчук Т. А., Ізутинська Г. О. Регуляція антимікробної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405// *Мікробіол. журнал.* – 2017. – 79, №3 – С. 43-54
5. McGowan J.E.Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum // *Am. J. Med.* – 2006. – 6, № 1. – Р. 29–36.
6. Балко А.Б. Характеристика, свойства, перспектива применения бактериоцинов // *Мікробіол.журнал.* – 2012. – Т. 74, №6.
7. Riley M.A., Chavan M. Bacteriocins: ecology and evolution. – Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. – 2007. Р. – 154 p.
8. Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2012. – Т.48, №3. – С.259-275.
9. T.C .Chung., L .Axelsson., S.E .Lindgren., W.J. Dobrogosz In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri* // *Microbial ecology in health and disease* – 1989. – V.2. – Р. 137-144.
10. L. Benitez, A. Correa, D. Daroit, A. Brandelli. Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is Enhanced in the Presence of *Escherichia coli* // *Curr Microbiol.* – 2011. – V.62. – Р. 1017–1022.

11. *A. Bertsch, D. Roy, G. LaPointe*. Enhanced exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* in Co-Culture with *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Sci.* – 2019. – V.9, № 4026.
12. *H. Majeed1, O. Gillor1, B. Kerr ma ihui*. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins // *The ISME Journal*. – 2011. - №5. – P. 71-81.
13. *B. Rojo-Bezares Yolanda, S. L. Navarro ma ihui*. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must // *Food Microbiology*. – 2007. – V.24, – P. 482-491.
14. *J.Y. Chang, H.J. Lee, H.C. Chang*. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7 // *Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – №103. – C. 2504–2515.
15. *R. Mohammadzadeha, A. Azadegan, B. S. Kalan*. Listeriolysin S may inhibit the anti-listerial properties of *Lactobacillus plantarum* // *Microbial Pathogenesis*. – 2019. – № 137.
16. *N. T. Trang Le, L. G. Bach, D. C. Nguyen ma ihui*. Evaluation of Factors Affecting Antimicrobial Activity of Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* Microencapsulated in Alginate-Gelatin Capsules and Its Application on Pork Meat as a Bio-Preservative // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2019. – V.16, № 1017.
17. *Luc D. Vuyst, R. Callewaert, Kurt Crabbe*. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions // *Microbiology*. – 1996. – №142. – P. 817-827
18. *Huaxi Yi, Xue Han, Yanyan Yang та ihui*. Effect of Exogenous Factors on Bacteriocin Production from *Lactobacillus paracasei* J23 by Using a Resting Cell System // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – №14. – P. 24355-24365.

19. *E.Vamanu, A. Vamanu* . The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB16 // Afr. J. Microbiol. Res. – 2010. – V.4, №7. – P. 534-537.
20. *Гюльахмедов С. Г., Гусейнова Н. Ф., Абдуллаева Н. А., Кулиев А. А.* Влияние лецитина и казеина на спектр антимикробной активности бактериоцинов молочнокислых бактерий, изолированных из азербайджанских сыров // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. – 2011. – Т.1, № 2. – С. 31-34
21. *Вахитов Т.Я., Вербицкая Н.Б, Добролеж О.В та інші.* Влияние метаболитов пробиотических и патогенных бактерий на антагонистическую активность *L.acidophilus* D № 75 // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – Т.8, № 92.
22. *Балко О.І., Ярошенко Л.В, Балко О.Б. та інші.* Активність бактериоцинів *P. aeruginosa* щодо фітопатогенних бактерій *P. syringae* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – №2. – С. 51-60.
23. *Балко О.І., Видасов В.В, Авдеева Л.В.* Оптимизация условий индукции бактериоцинов *P. aeruginosa* // Микробиол. Журн. – 2013. – Т. 75, №1
24. *P. Malheros, V. Anna, S.D. Todorov.* Optimization of growth and bacteriocin production *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a // Brazilian Journal of Microbiology. – 2015. – V.46, №3. – P. 825-834.
25. *Bing Han, Zhanqiao Yu, Baosheng Liu, Qingshan Ma and Rijun Zhang.* Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens // African Journal of Microbiology Research. – 2011. – V.5, № 10. – P. 1147-1155.
26. *V. H. Nehal, S. Visnuvinayagam, L. N. Murthy та інші.* Characterization of *Vibriocin* and Prospect of Co-Culture Method to Overcome the Diminishing Antibacterial Activity // Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. – 2019. – V.10, №8. – P. 671-681.
27. *Зимина М.И., Просеков А.Ю., Сухих С.А.* Определение оптимальных условий культивирования для синтеза бактериоцинов штаммами

- Bacillus endopheticus* и *Bacillus licheniformis* и изучение их стабильности // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 43, № 4.
28. Гюльяхмедов С.Г., Кулиев А.А. Влияние температуры и pH среды на титр бактериоцина штамма *E. faecium* J1-48 // Advances in Biology & Earth Sciences. – 2016. – V.1, №.1. – P.81-87.
29. D. B. Diep, L. Axelsson, C. Grefsl. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a threecomponent regulatory system // Microbiology. – 2010. – №146. – P. 2155–2160.
30. M.I. Zimina, A.J. Prosekov, O.O. Babich, S.A. Sukhikh . Identification and studying of the biochemical properties of lactobacillus strains // Life Science Journal. – 2014. – № 11. – P. 338-341.
31. Абдуллаева Н.Ф. Зульфугарлы В.Ш. Гюльяхмедов С.Г. Кулиев А.А. Влияние температурных условий на биосинтез и секрецию бактериоцина штамма *Lactobacillus pentosus* M3 // BIOLOGICAL SCIENCES / «Colloquium-journal» . – 2019. – V.27, № 3.
32. Пирог Т. П., Конон А. Д., Софилканич А. П., Иутинская Г. А. Действие поверхностно активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В 7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас 5017 и *Nocardia vaccinii* К 8 на фитопатогенные бактерии // Прикл. биохимия и микробиология. - 2013. - Т.49, №4. - С. 364–371.
33. Chebbi A, Elshikh M, Haque F, Ahmed S, Dobbin S, Marchant R, Sayadi S, Chamkha M, Banat IM. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection // J Basic Microbiol. – 2017. – 57, 5. – P. 364–375
34. M-ZV Gomes, M. Nitschke Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces. Lett Appl Microbiol. – 2012. – V. 49. – P. 960–965.

35. R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, L.R. Rodrigues, J.A. Teixeira, G.M. Campos-Takaki Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2011. – V. 84. – P. 1–5.
36. A. Bertsch, D. Roy, G. LaPointe. Enhanced exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* in Co-Culture with *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Sci.* – 2019. V.9, № 4026
37. Onaka H., Mori Y., Igarashi Y., Furumai T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – P. 400–406
38. Пирог Т. П., Никитюк Л. В., Макієнко В. О., Шевчук Т. А., Ігутинська Г. О. Регуляція антимікробної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405// *Мікробіол. журнал.* – 2017. – 79, №3 – С. 43-54
39. Пирог Т. П., Никитюк Л. В., Антонюк С. І., Шевчук Т. А., Ігутинська Г.О. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій олії різної якості та їх антимікробна активність // *Мікробіол. журнал.* – 2017. – 79, №2. - С. 12-15
40. В.О. Макієнко, Т.П. Пирог Індукція синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 з підвищеною антимікробною та антиадгезивною активністю // *Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку. II Міжнародна науково-практична інтернет-конференція.* – 2018. – С. 91-96
41. Devendra H. Dusane, Pratiek Matkar, Valayam P. Venugopalan, Ameeta Ravi Kumar, Smita S. Zinjarde Cross-Species Induction of Antimicrobial Compounds, Biosurfactants and Quorum-Sensing Inhibitors in Tropical Marine Epibiotic Bacteria by Pathogens and Biofouling Microorganisms // *Curr Microbiol.* – 2011. – V. 62. – P. 974–980

42. L. Benitez, A. Correa, D. Daroit, A. Brandelli. Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is Enhanced in the Presence of *Escherichia coli* // Curr Microbiol. – 2011. – V.62. – P. 1017–1022.
43. Пирог Т.П., Никитюк Л.В., Кондрашевська К.Р., Ключка І.В. Вплив поверхнево-активних речовин, синтезованих у різних умовах культивування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на деструкцію біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 // Наукові праці НУХТ. – 2017. – 23, №2. – С. 23-30
44. D. Dalilia, M., Aminib, Isolation and structural characterization of Coryxin, a novel cyclic lipopeptide from *Corynebacterium xerosis* NS5 having emulsifying and anti-biofilm activity // Colloids Surf. B: Biointerfaces. – 2015. – V. 135. – P. 425—432
45. M.A.D .De Rienzo., P.J. Martin. Effect of mono and di-rhamnolipids on biofilms preformed by *Bacillus subtilis* BBK006 // Curr. Microbiol.. – 2016. – V.73. – P. 183—189.
46. A. R. Padmavathi, S. K. Pandian. Antibiofilm activity of biosurfactant producing coral associated bacteria isolated from gulf of mannar // Indian J. Microbiol. – 2014. – V. 54. – P. 376—382.
47. Пирог Т. П., Конон А. Д., Береговая К. А., Шулякова М. А. Антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 // Микробиол. – 2014. – 86, № 6. – С. 631–639
48. Покора Х. А., Пирог Т. П. Антиадгезивна активність поверхнево-активний речовин *Nocardia vaccinii* К-8 // Наукові праці НУХТ – 2010. – № 48. – С. 34-45
49. Пирог Т. П., Антонюк С. І., Софілканич А. П. трансформація ароматичних сполук у поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 , *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 // Наукові праці НУХТ. – 2016. – 22, №1. – С. 75-92.

50. *Vyas T. K., Dave B. P.* Production of biosurfactant by *Nocardia otitidiscaviarum* and its role in biodegradation of crude oil // Environ. Sci. Tech. – 2011. – 8, N2. – P. 425-432
51. *Tarek A. A. Moussa, Gaber M. Ahmed, Shereen M.S Abdel-Hamidu* Mathematical model for biomass yield and biosurfactant production by *Nocardiaamarae*// Biotechnol. Adv. – 2010. – 28, N2. – P. 65–89.
52. *Yii W. J., Yeh K-L., Lu W.-B. , Lin C.-L., Chang J-S.* Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site // Bioresour. Technol.. – 2008. – 99. – P. 1157-1164
53. «ТОП-10 експортерів зернових України 2018» Електронний ресурс  
Режим доступу: <https://latifundist.com/rating/top-10-eksporterov-zernovyh-ukrainy-2018>
54. «Експорт зерна в Україні з початку сезону перевищив 7 млн т»  
Електронний ресурс Режим доступу:  
<https://elevatorist.com/novosti/8794-eksport-zerna-v-ukraine-s-nachala-sezona-prevyisil-7-mln-t>
55. «ЗЕРНОВІ КУЛЬТУРИ В УКРАЇНІ І СНД» Електронний ресурс  
Режим доступу: <https://buklib.net/books/30092/>
56. *Омельченко В. Д.* Зерна, поврежденные и испорченные микроорганизмами и самосогреванием как критерий санитарно-гигиенического состояния пшеницы и кукурузы : автореф. дисс. ... к.т.н. / В. Д. Омельченко. – М., 1991. – С. 1–9
57. Грибные болезни зерновых культур / М. М. Левитин, С. А. Тютюрев // Защита и карантин растений. – 2003. – №11. – С. 76
58. *Назарова Л. Н.* Прогрессирующие болезни зерновых культур / Л. Н. Назарова, Е. А. Соколова // Агро XXI. – 2000. – №4. – С. 2–3
59. «Оцінка впливу мікробіологічних процесів під час зберігання зерна ярої пшениці» Електронний ресурс Режим доступу:  
[https://agromage.com/stat\\_id.php?id=1114](https://agromage.com/stat_id.php?id=1114)

60. Пирог Т. П., Берегова Х. А., Савенко І. В., Шевчук Т. А., Ізутинська Г.О. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Nocardia vacciniі* ІМВ В-7405 // Мікробіол. журнал. – 2015. – 77, №6.
61. Пирог Т. П., Конон А. Д., Софилканич А. П., Іутинская Г. А. Действие поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 и *Nocardia vacciniі* ІМВ В-7405 на фитопатогенные бактерии // Прикл. биохим. и микробиол.. – 2013. – 49, № 4.
62. «Стан пшениці у 2019 році» Електронний ресурс Режим доступу: <https://kurkul.com/agro-ekspeditsiyi/581-stan-pshenitsi-v-ukrayini-v-2019-rotsi--agroekspeditsiya>
63. «Хліб в Україні: аграрії виграють, споживачі – програють?» Електронний ресурс Режим доступу: [https://zik.ua/news/2018/09/13/hlib\\_v\\_ukraini\\_agrarii\\_vygrayut\\_spozhyvac\\_hi\\_prograyut\\_1405509](https://zik.ua/news/2018/09/13/hlib_v_ukraini_agrarii_vygrayut_spozhyvac_hi_prograyut_1405509)
64. ЧП "Скляр А.І."(ранее ПКП Стройэкс) Електронний ресурс Режим доступу: <http://www.stroiex.com.ua/zerno.html>
65. Електронний ресурс Режим доступу: <http://docs.cntd.ru/document/1200030828>
66. Електронний ресурс Режим доступу: <https://logosib.ru/vimol>
67. Електронний ресурс Режим доступу: <https://agromolzapchast.com/ishop/product/1134>
68. Електронний ресурс Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>
69. Пат. № 81803 UA.Штам бактерій *Nocardia vacciniі* ІМВ В-7405 як продуцент поверхнево-активних речовин. // Пирог Т.П., Мащенко О.Ю., Покора Х.А., Гриценко Н.А. – Опубл. 10.07.2013. Бюл.№ 13
70. Yovanovic M., Djukic M., Vasiljevic I., Ninkovic M., Yovanovic M. Determination of nitrate by the IE-HPLC-UV method in the brain tissues of

Wistar rats poisoned with paraquat // J. Serb. Chem. Soc. – 2007. –Vol 4. –  
N 72. – P. 347–356

**71.** *Szymanowska-Powalowska D.* The effect of high concentration of glycerol on the growth, metabolism and adaption capacity of *Clostridium butyricum* DSP1 // Electron. J. Biotechnol., - 2015, - № 18 - P 128.