

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

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

« 06 » червня 2025 р.

« 06 » червня 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Культивування *Cryptococcus laurentii* для біосинтезу наночастинок срібла

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

ДЯЧИШИНА Анастасія Василівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

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

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова,»

харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Дячишиної Анастасії Василівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Cryptococcus laurentii* для біосинтезу наночастинок срібла

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

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Cryptococcus laurentii*; цільовий продукт: наночастинки срібла; геометричний об'єм ферментера: 4 л; коефіцієнт заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва; специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; контроль виробництва; аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва; нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу наночастинок срібла - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу наночастинок срібла - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Характеристика наночастинок срібла</i>	01.03.25-10.03.25	
2	<i>Обґрунтування вибору біологічного агента для біосинтезу наночастинок срібла</i>	11.03.25-20.03.25	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	21.03.25-27.03.25	
4	<i>Біосинтез біомаси</i>	28.03.25-04.04.25	
5	<i>Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва</i>	05.04.25-06.04.25	
6	<i>Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	12.04.25-20.04.25	
7	<i>Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	21.04.25-30.04.25	
8	<i>Контроль виробництва</i>	01.05.25-09.05.25	
9	<i>Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва</i>	10.05.25- 27.05.25	
10	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	28.05.25-31.05.25	
11	<i>Оформлення графічної частини</i>	28.05.25-31.05.25	

Здобувач _____
(підпис)

Анастасія ДЯЧИШИНА _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Оксана СКРОЦЬКА _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу наночастинок срібла з використанням у якості біологічного агента *Cryptococcus laurentii* VNM 0525, який після 24 год культивування використовують у процесі біосинтезу наночастинок срібла протягом 48 год та отримують наночастинок розміром 35 нм сферичної форми. Срібні наночастки мають протимікробні та противірусні властивості, що робить їх потенційно ефективними в боротьбі з респіраторними інфекціями. Розрахована потужність виробництва становить 1,05 г (57,4 л культуральної рідини) наночастинок срібла за місяць, що забезпечить 1% пацієнтів з інфекційними хворобами дихальних шляхів. Технологічна схема біосинтезу наночастинок срібла включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка та стерилізацію розчину нітрату срібла, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (одна стадія вирощування посівного матеріалу, виробниче культивування у ферментері об'ємом 4 л з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання наночастинок срібла передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом, центрифугування культуральної рідини, промивання біомаси деіонізованою водою, інактивації клітин дріжджів та біосинтез у реакторі після додавання у реакційну суміш нітрату срібла. Розроблено карту постадійного контролю допоміжних робіт та технологічного процесу з наведенням методів контролю концентрації біомаси, джерела азотного та вуглецевого живлення, а також методик контролю срібних наночастинок. Кваліфікаційна робота викладена на 77 сторінках, містить 9 таблиць, 8 рисунків, складається зі вступу, 9 розділів, списку використаної літератури (69 найменувань), 5 додатків, технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем. 1

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА.....	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА.....	13
2.1. Обгрунтування вибору біологічного агента для отримання наночастинок срібла та поживного середовища для культивування.....	13
2.2. Характеристика біологічного агента <i>Cryptococcus laurentii</i>	19
2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки <i>Cryptococcus laurentii</i> ...	19
2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Cryptococcus laurentii</i>	21
2.3. Таксономічний статус <i>Cryptococcus laurentii</i>	22
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	23
3.1. Потреба населення України у наночастинках срібла для лікування інфекційних захворювань дихальних шляхів.....	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва наночастинок срібла.....	25
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	26
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу <i>Cryptococcus laurentii</i>	27
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ <i>CRYPTOCOCCUS LAURENTII</i> ...	30
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента...	30

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у біомасу <i>Cryptococcus laurentii</i>	32
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	36
5.1. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря	36
5.2. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	37
5.2.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	37
5.2.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва наночастинок срібла.....	50
5.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>Cryptococcus laurentii</i> BNM 0525 ...	57
5.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках	57
5.3.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 4 л	59
5.4. Особливості підготовки розчину нітрату срібла	
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	61
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.....	63
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА.....	68
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	75
9.1. Мікробіологічний контроль.....	75

9.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти поживних середовищ	64
9.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	64
9.2. Контроль показників росту.....	75
9.2.1. Визначення концентрації біомаси.....	75
9.2.2. Визначення джерела Карбону в середовищі.....	77
9.2.3. Визначення джерела Нітрогену в середовищі	78
9.3. Характеристика цільового продукту (наночастинок срібла).....	78
9.3.1. Спектрофотометричний аналіз наночастинок срібла.....	79
9.3.2. Вимірювання на наносайзері.....	79
9.3.3. Трансмійна електронна мікроскопія.....	79
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	80
ДОДАТКИ.....	91

ВСТУП

Наночастинки срібла знайшли своє використання у багатьох сферах промисловості. Наприклад, наносрібло може входити до складу біосенсорів, що застосовуються у медицині та інших галузях. Воно також можуть бути використані у якості покриття для хірургічних та стоматологічних інструментів, або ж у текстильній та металургійній промисловості [1].

Необхідно відмітити, що найбільш затребуваними властивостями, якими характеризуються наночастинки срібла, є їх виражена антимікробна дія. Саме вона зумовлює їх використання у медицині в якості фунгіцидних, бактерицидних та віруліцидних агентів. Завдяки їх протимікробній активності, срібні наночастинки також застосовуються у ветеринарії, косметичі та продуктах харчування у якості консервантів. Більше того, є повідомлення про здатність наночастинок срібла пригнічувати розвиток ракових клітин, що робить їх ще більш бажаним продуктом і породжує потребу у пошуку найбільш оптимальних методів їх синтезу [1,2,3].

Срібні наночастинки можуть бути отримані багатьма методами, проте найбільш вживаними є фізичний, хімічний та біологічний. Перші два методи вважаються традиційними, проте, з іншого боку, є потенційно проблематичними, зважаючи на шкідливий вплив на екологію. В той же час, біосинтез наночастинок срібла в останній час набирає популярності, адже не несе небажаних наслідків для навколишнього середовища, а також не потребує такої кількості ресурсів та грошових вкладень. Зважаючи на це, актуальним є дослідження та розробка якомога більш продуктивних методів біологічного синтезу наночастинок срібла з заданими характеристиками [1,4,5].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дячишина А. В.			ВСТУП	Літ..	Арк..	Аркуші
Перевір.							7	74
Реценз.		Скороцька О.І.				8		
Н. Контр. Н.						БТ-4-2		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Біосинтез наночастинок срібла може бути здійснений з використанням багатьох організмів, зокрема рослин, бактерій, грибів, дріжджів та водоростей. Використання мікробних біологічних агентів, порівняно з рослинними, має більше переваг, адже не потребує великих площ для вирощування сировини та є займає менше часу. Мікробними продуцентами наночасток срібла можуть бути штами *Penicillium chrysogenum* FGCC/BLS1, *Aspergillus flavus* IG104, *Aspergillus fumigatus* DSM819 та *Cryptococcus laurentii* BNM 0525. Гриби *Cryptococcus laurentii* BNM 0525 мають суттєву перевагу над іншими вище перерахованими мікроорганізмами, адже за їх використання можна отримати сферичні наночастинки з діаметром 35 нм після 24 год культивування [1,4].

Отже, новизною даної роботи є використання грибів *Cryptococcus laurentii* BNM 0525, що здатні після 24 год культивування біологічного агента та 48 год біосинтезу утворювати наночастинки з діаметром 35 нм та сферичної форми. Метою кваліфікаційної роботи є проектування ділянки доферментаційних процесів, виробничого культивування та біосинтезу наночастинок срібла з використанням у якості біологічного агента дріжджів *Cryptococcus laurentii* BNM 0525, а також складення технологічної та апаратурної схеми процесу.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Як правило, наночастинки срібла (AgNPs) - це маленькі частки срібла розміром від 1 до 100 нм. Срібло має молекулярну масу: 107,8682 г/моль, температуру розкладання: 2212°C, температуру плавлення: 961,78°C, температуру кипіння: 2162°C. Малорозчинне у воді, добре розчинне в лугах і кислотах. Срібло має антимікробну дію широкого спектру [6]. AgNPs можуть мати різну форму, наприклад сферичну, паличкоподібну, восьмикутну, шестикутну, трикутну, квіткоподібну тощо [7]. Срібло має чудову бактеріостатичну та дезінфікуючу дію. Коли розмір частинок срібла зменшується до нанометрового рівня, його бактеріостатичний ефект стає більш вираженим, тому наносрібло має велику перевагу для антибактеріальних застосувань [8]. Наночастинки срібла (AgNPs) широко використовуються як засоби для боротьби з бактеріями у сферах зберігання харчових продуктів, медицини, виробництва текстилю та для вирішення різноманітних екологічних завдань [9].

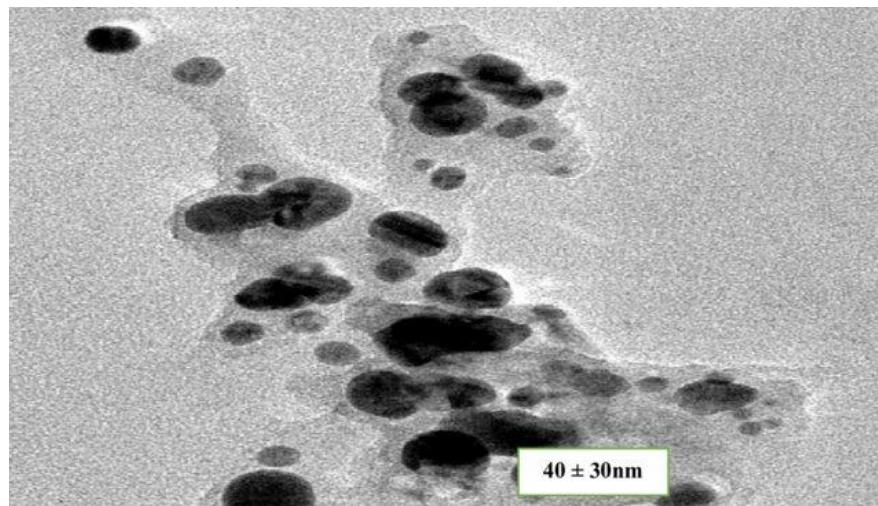


Рис. 1.1. Мікрофотографія наночастинок срібла (трансмісійний електронний мікроскоп) [10]

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дячишина А. В.			Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.						9	
Реценз.		Скороцька О.І.			10		
Н. Контр. Н.					БТ-4-2		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Існують три основні методи синтезу AgNPs — фізичний синтез, хімічний синтез і біосинтез. У ранніх дослідженнях наночастинки срібла в основному отримували фізичними методами. Методи хімічного синтезу покладаються на контроль умов хімічної реакції, розмір частинок срібла може досягати лише кількох нанометрів, а умови реакції хімічного синтезу суворі, хімічні відходи спричиняють забруднення навколишнього середовища і кінцевий продукт часто містить багато домішок [8]. Біологічний синтез наночастинок є простим, економічно ефективним, надійним і екологічно чистим методом. Багато уваги приділяється високопродуктивному виробництву AgNPs заданого розміру з використанням різних біологічних систем, включаючи бактерії, гриби, дріжджі.

Синтез наночастинок срібла за допомогою грибів викликає великий інтерес через економічні перспективи та потенційне застосування в різних галузях. Гриби - це ще одна група організмів, які виробляють різні ферменти і білки, які можуть відновлювати, а також стабілізувати наночастинки металів. Здатність до синтезу наночастинок срібла мають багато грибів, таких як *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* та *Penicillium sp.*

Для синтезу наночастинок бактеріальні види розглядалися як потенційні кандидати через їхню властиву здатність відновлювати важкі метали, оскільки клітинна стінка бактерій відповідає за відновлення завдяки наявності різних важливих функціональних груп. Деякі важливі види бактерій, які можуть допомогти в біологічному синтезі наночастинок срібла за допомогою внутрішньоклітинних і позаклітинних механізмів - це *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus spp.* та *Pseudomonas aeruginosa* тощо [11].

Завдяки масовому виробництву наночастинок, а також легкості контролю над дріжджовими клітинами в лабораторних умовах, синтезу численних ферментів і швидкому росту з використанням простих поживних речовин, дріжджові штами мають більше переваг перед бактеріями. Серед них виділяють такі продуценти: *Cryptococcus laurentii*, *Candida glabrata*,

Schizosaccharomyces pombe, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* [12,13,14].

Срібло стало одним із найкраще вивчених олігодинамічних матеріалів завдяки його діапазону бактерицидних дій, ефективності, низькій токсичності та різноманітному застосуванню як дезінфікуючого засобу. Олігодинамічний ефект — це біоцидний ефект металів, особливо важких металів, який може виникати при низьких концентраціях. Доведено, що наночастинки срібла мають олігодинамічний ефект завдяки великій площі поверхні, здатності зв'язуватися з бактеріальними біомолекулами, здатності проникати в клітини, генерувати активні форми кисню (АФК) і вільні радикали, а також діяти як модулятори в шляхи передачі сигналу мікроорганізмів. Багато уваги приділяється широкому спектру олігодинамічних матеріалів, зокрема AgNPs, які можуть сприяти розвитку нанотерапевтичних засобів, таких як антибіотики [15].

Виробниками наночастинок срібла є:

- Now Foods (США) – форма випуску – спрей, містить 10 мкг срібла в 1 мл [16];
- American Biotech Labs (США) – форма випуску – паста, містить 4 рідкі унції з сріблом [17].

Препарати, представлені на ринку України, що містять наночастки срібла:

- Рослина карпат (Україна): препарат Аргентум-S – колоїдне срібло, 5 мг/л [18];
- Trace Minerals Research (США): препарат Colloidal Silver – колоїдне срібло, 30 мг/л [16].

Наночастинки срібла та їхні наноконкомпозити мають величезний потенціал для застосування в різних галузях науки та нанотехнологій, особливо в біомедицині та терапії. Вони являють собою перспективні протимікробні, протипухлинні та терапевтичні засоби. Завдяки унікальним властивостям срібла та його наноматеріалів, їх зараховують до цінних і

важливих наноматеріалів з величезним потенціалом і можливістю застосування в галузі нанотехнологій.

Незважаючи на величезний біомедичний потенціал наночастинок срібла, важливо зазначити, що можливі ризики для здоров'я та навколишнього середовища, пов'язані з наночастинками срібла, досі не з'ясовані, і подальший аналіз із доказами токсичності є потребою часу. Необхідно проводити більше досліджень і розробляти стратегії управління системною токсичністю для людей, інших тварин, водних екосистем, ґрунту і атмосфери через зростаюче використання і попит на продукти на основі наносрібла на комерційних ринках. Крім того, противірусна активність наночастинок срібла також потребує більш детального уточнення. Таким чином, виробництво наночастинок з добре контрольованими морфологічними та фізико-хімічними характеристиками для використання в організмі людини та інших сферах все ще залишається сферою активних міждисциплінарних досліджень [19].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента для отримання наночастинок срібла та поживного середовища для культивування

Одне із перших досліджень отримання наночастинок срібла проводилося у 1889 році. М. Кері Лі, механохімік із Філадельфії, вперше повідомив про синтез стабілізованого цитратом колоїду срібла за допомогою методу відновлення. З тих пір по всьому світу було опубліковано безліч робіт, в яких повідомляється про синтез наночастинок срібла, аналізуються їх фізико-хімічні властивості, наприклад розмір, форма та інші характеристики та можливості застосування у різних сферах науки [20].

Наразі біосинтез наночастинок срібла здійснюють з використанням різноманітних мікроорганізмів, серед яких *Penicillium chrysogenum* FGCC/BLS1 [21], *Aspergillus flavus* IG104 [22], *Aspergillus fumigatus* DSM819 [23] та *Cryptococcus laurentii* BNM 0525 [24].

Перед початком аналізу даних, отриманих після опрацювання статей, присвячених біосинтезу наночастинок срібла, варто зазначити, що найбільш перспективним вважається використання AgNPs як антимікробних агентів. В той же час, антимікробна активність срібних наночастинок залежить від їх розміру: зі зменшенням AgNPs їх антибактеріальні, протигрибкові й противірусні властивості стають більш вираженими [21]. Таким чином, при виборі продуцента наночастинок срібла доцільним буде врахувати розмір як один із ключових показників синтезу.

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дячишина А. В.			Літ..	Арк..	Аркуші
Перевір.						13	
Реценз.		Скороцька О.І.			14		
Н. Контр. Н.					БТ-4-2		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Іншим важливим показником, як і для більшості біотехнологічних процесів, є тривалість культивування продуцента. Необхідно відмітити, що безпосередній біосинтез наночастинок срібла та культивування продуцента є окремими операціями, тому при виборі біологічного агента слід враховувати тривалість обох процесів.

Детальний аналіз використання для біосинтезу наночастинок срібла різних продуцентів наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Особливості одержання наночастинок срібла за допомогою різних мікроорганізмів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Особливості процесу культивування	Умови біосинтезу наночастинок срібла	Форма, розміри наночастинок та їх властивості	Використана література
	Компонент	Концентрація, г/л				
<i>Cryptococcus laurentii</i> BNM 0525	Казеїновий пептон	17,5	рН 7.4, 28°C, 24 год, 100 об/хв.	Супернатант, 1 мМ AgNO ₃ , 28°C, 48 год, 100 об/хв	Сферичні, 35 нм антифунгальні властивості по відношенню до <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Alternaria</i> sp., та <i>Rhizopus</i> sp.	Fernández J.G., Fernández-Baldo M.A., Berni E. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. Process Biochemistry. 2016. doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.021.
	Яловичий екстракт	2				
	Кукурудзяний крохмаль	1,5				
<i>Penicillium chrysogenum</i> FGCC/BLS1	Декстроза	20	28°C, 120 год.	Водний грибний екстракт, 2 мМ AgNO ₃ , 70°C, рН 11, 8 год, 100 об/хв	Еліпсоподібні, 96.8 нм Антибактеріальна активність по відношенню до грамнегативних бактерій <i>Esherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> та грампозитивних бактерій <i>Staphylococcus aureus</i>	Saxena, J., Sharma, P., & Singh, A. (2017). Biomimetic synthesis of AgNPs from <i>Penicillium chrysogenum</i> strain FGCC/BLS1 by optimising physico-cultural conditions and assessment of their antimicrobial potential. IET nanobiotechnology, 11(5), 576–583. https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0097
	Екстракт картоплі	30				

Закінчення табл. 2.1

<i>Aspergillus flavus</i> IG104	Глюкоза	10	рН 7,0, 33°C, 72 год, 150 об/хв.	Водний грибний екстракт, 1 мМ AgNO ₃ , 27°C, рН = 4, 144 год, (в темряві), 150 об/хв	Сферичні, 35 нм Антибактеріальна активність по відношенню до грамнегативних бактерій <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> та грампозитивних бактерій <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Al-Soub, A., Khleifat, K., Al-Tarawneh, A., Al-Limoun, M., Alfarrayeh, I., Sarayreh, A. A., Qaisi, Y. A., Qaralleh, H., Alqaraleh, M., & Albashaireh, A. (2022). Silver nanoparticles biosynthesis using an airborne fungal isolate, <i>Aspergillus flavus</i> : optimization, characterization and antibacterial activity. Iranian journal of microbiology, 14(4), 518–528. https://doi.org/10.18502/ijm.v14i4.10238
	Дріжджовий екстракт	10				
	NaCl	5				
<i>Aspergillus fumigatus</i> DSM819	NaNO ₃	2	1 мМ AgNO ₃ , 30 °C, 144 год, 100 об/хв.	Водний грибний екстракт, 1,5 мМ AgNO ₃ , рН 10,0, 90 хв	Сферичні, 84,4 нм Антибактеріальна активність по відношенню до <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus mycoides</i> , протикандидозна активність по відношенню до <i>Candida albicans</i> , протиракова активність по відношенню до НСТ116, А549, МСF7, РС3	Othman, A. M., Elsayed, M. A., Al-Balakocy, N. G., Hassan, M. M., & Elshafei, A. M. (2019). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities. Journal, genetic engineering & biotechnology, 17(1), https://doi.org/10.1186/s43141-019-0008-1
	KH ₂ PO ₄	1				
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5				
	KCl	0,5				
	Глюкоза	20				

Дані, зазначені у табл. 2.1, свідчать про те, що найменші наночастинки срібла утворюються при використанні *A. flavus* IG104 [22] та *C. laurentii* BNM 0525 [24], в той час як AgNPs, синтезовані за допомогою *A. fumigatus* DSM819 [23], були в 2,4 рази більші, а отримані з *P. chrysogenum* FGCC/BLS1 – майже в 2,8 разів [21]. До того ж, срібні наночастинки, синтезовані за допомогою *A. flavus* IG104 та *C. laurentii* BNM 0525 проявляли протибактеріальні та протигрибкові властивості, відповідно [22,24]. Найшвидше проходило культивування *C. laurentii* BNM 0525 [24], при цьому тривалість вирощування дріжджів була в 3 рази меншою, ніж для *A. flavus* IG104 [22], в 5 разів меншою, ніж для *P. chrysogenum* FGCC/BLS1 [21], і в 6 разів меншою, ніж для *A. fumigatus* DSM819 [18]. В той же час, при використанні *A. fumigatus* DSM819 спостерігався найкоротший біосинтез срібних наночастинок, що був в 5,3 рази швидшим порівняно з *P. chrysogenum* FGCC/BLS1 [21], в 32 рази швидшим порівняно з *C. laurentii* BNM 0525 [19] та в 96 разів швидше порівняно з *A. flavus* IG104 [22].

При виборі продуцента важливим також є порівняння вартості поживних середовищ для культивування біологічного агента. Вартість 1 л поживного середовища для вирощування мікроорганізмів, включно з вартістю кожного компонента, наведено в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, що застосовуються для біосинтезу наночасток срібла

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Cryptococcus laurentii</i> BNM 0525	Казеїновий пептон	17,5	211,65	3,7	1
	Яловичий екстракт	2	631,2	1,26	2
	Кукурудзяний крохмаль	1,5	18,15	0,027	3
Вартість 1 л середовища – 4,98 грн					

Закінчення табл. 2.2.

<i>Penicillium chrysogenum</i> FGCC/BLS1	Декстроза	20	63,5	1,27	4
	Екстракт картоплі	30	211,65	6,35	5
Вартість 1 л середовища – 7,62 грн					
<i>Aspergillus flavus</i> IG104	Глюкоза	10	19,72	0,197	6
	Дріжджовий екстракт	10	394,5	3,95	7
	NaCl	5	7,89	0,0395	8
Вартість 1 л середовища – 4,54 грн					
<i>Aspergillus fumigatus</i> DSM819	NaNO ₃	2	31,56	0,063	9
	KH ₂ PO ₄	1	47,34	0,047	10
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	39,45	1,97	11
	KCl	0,5	74,96	0,037	12
	Глюкоза	20	19,72	0,394	6
Вартість 1 л середовища – 2,5 грн					

Примітка.* – Ціни наведено станом на травень 2024 р. 1. https://www.alibaba.com/product-detail/ISO-Factory-Supply-High-Quality-Bulk-1600390806464.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.35ed166dEEo8Qb

2. <https://www.alibaba.com/product-detail/Microbiology-Tissue-EC-Culture-Media-Meat-1700007889873.html>

3. https://www.alibaba.com/product-detail/China-manufacture-price-of-Starch-Potato-60725340581.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.137b3966CiC7xs

4. https://www.alibaba.com/product-detail/B-C-I-Supply-Food-Grade-1600845625885.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_image.46c83c30f1rMt2&s=p

5. https://www.alibaba.com/product-detail/_62125670976.html?spm=a2700.7724857.0.0.e7a811cdHjmYnf

6. https://www.alibaba.com/product-detail/China-glucose-anhydrous-pharmaceutical-grade-glucose-1600398550018.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.48a1384fTM0I2b

7. https://www.alibaba.com/product-detail/Food-Additive-Raw-Material-Powder-Yeast-60764202001.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.2ccb1837JeKaKP

8. https://www.alibaba.com/product-detail/factory-supply-Sodium-chloride-NaCl-CAS-1600890299074.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.6ee37c45Bb7zrw

9. https://www.alibaba.com/product-detail/TTCA-Ensign-Sodium-citrate-powder-food-1600763063085.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.18b050aemL9q1I

10. https://www.alibaba.com/product-detail/1-KG-Fertilizer-0-52-34-60657264772.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.571463eb8OuBAh

11. https://www.alibaba.com/product-detail/for-bath-salt-epson-salt-magnesium-1600224036069.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.6b095185euCFc1

12. https://www.alibaba.com/product-detail/Food-ingredient-High-quality-98-potassium-60754009626.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.71ba1e9fijxHII

Як можна побачити з даних, наведених в табл. 2.2., найдешевше поживне середовище використовується для вирощування *A. fumigatus* DSM819 [23], вартість якого є майже в 2 рази меншою порівняно з середовищем для культивування *A. flavus* IG104 [22] та *C. laurentii* BNM 0525 [24] і більш ніж в 3 рази меншою, ніж середовище для вирощування *P. chrysogenum* FGCC/BLS1 [21]. Проте тривалість культивування *A. fumigatus* DSM819 є найвищою серед порівнюваних біологічних агентів, до того ж після біосинтезу утворюються наночастинки великих розмірів [23]. Найдорожче середовище використовується для вирощування *P. chrysogenum* FGCC/BLS1, до того ж мікроорганізм відзначається високою тривалістю культивування, що робить його не оптимальним для використання [21].

Як уже зазначалося раніше, найменші наночастинки утворюються при використанні для біосинтезу супернатанту *C. laurentii* BNM 0525 [24] та водного грибного екстракту *A. flavus* IG104 [22], при цьому 1 л поживного середовища для культивування *A. flavus* IG104 є на 0,52 грн дешевшим за 1 л середовища для *C. laurentii* BNM 0525. Проте культивування та біосинтез наночастинок при використанні *C. laurentii* BNM 0525 проходить в 3 рази швидше, ніж за допомогою *A. flavus* IG104. Таким чином, найбільш оптимальним біологічним агентом для біосинтезу наночастинок срібла варто визнати *C. laurentii* BNM 0525.

Таким чином, для біосинтезу наночастинок срібла було обрано *Cryptococcus laurentii* BNM 0525, після культивування якого протягом 24 год на середовищі вартістю 4,98 грн/л можна отримати сферичні наночастинки діаметром 35 нм за інкубування супернатанту протягом 48 год [24].

2.2. Характеристика біологічного агента *Cryptococcus laurentii*

2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки *Cryptococcus laurentii*

Cryptococcus laurentii (Сучасна назва: *Papiliotrema laurentii*, синоніми: *Rhodotorula laurentii*, *Rhodotorula nitens*, *Torula laurentii*, *Torulopsis laurentii*) [25] класифікується як базидіоміцет. Ці гриби в культурі ростуть як дріжджі.

Клітини мають яйцеподібну форму, розміри 2-5 x 3-7 мкм, і вони інкапсульовані. Дріжджові клітини групуються в ланцюжки по 3-4.

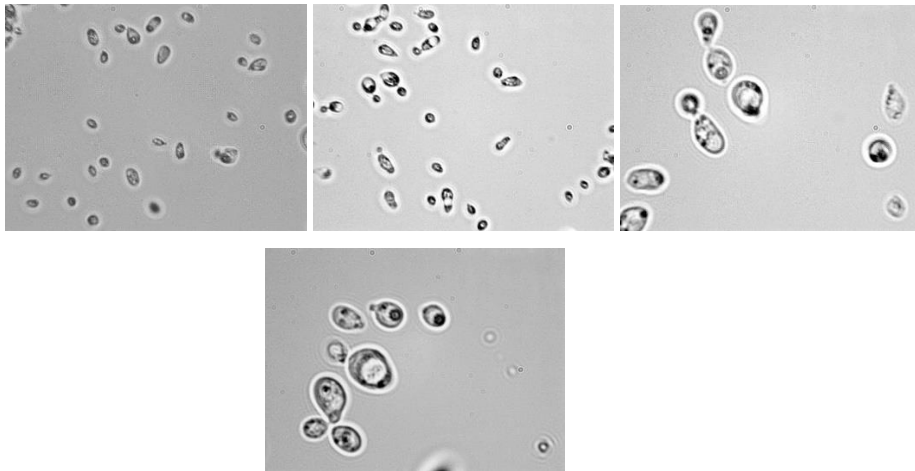


Рис. 2.1. Спори *C. laurentii* (x90)

Колонії на солодовому агарі характеризуються гладкістю, блискучістю та кремовим виглядом, який може темніти до жовто-оранжевого кольору.

У рідині *Cryptococcus laurentii* проявляють флокуляцію, тобто утворення згрупованих структур. [26]

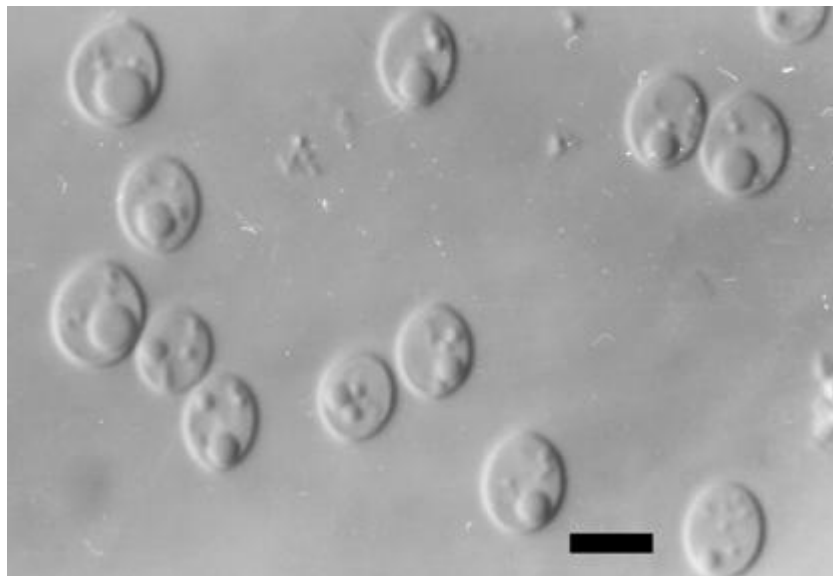


Рис. 2.2. Морфологія *Cryptococcus laurentii* (BCRC 22249), вирощеного в глюкозно-дріжджовому екстрактно-пептонному бульйоні протягом 3 днів при 25°C [27]

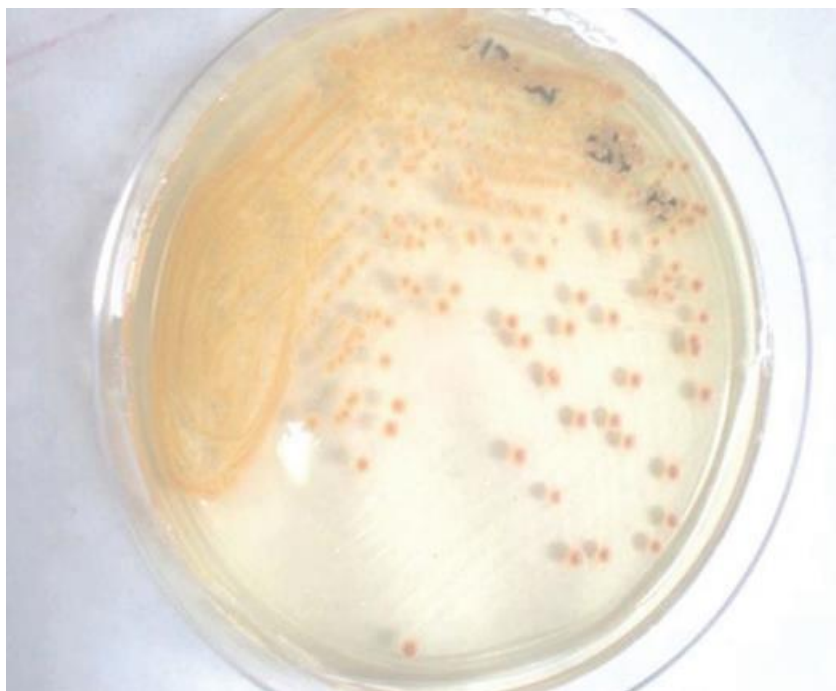


Рис. 2.3. Ізольовані *C. laurentii* на SDA (sawdust ash) - кремові гладкі колонії після 48 годин інкубації [28]

2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки *Cryptococcus laurentii*

C. laurentii виявляє факультативну алкалофільність та психрофільні властивості, володіє здатністю утворювати дріжджовий фактор, що призводить до загибелі дріжджів. Він широко поширений в більшості ґрунтів, зокрема в арктичних, степових і тундрових регіонах.

Цей гриб проявляє домінування в екосистемі незрілих ягід винограду і залишається присутнім, навіть коли виноград дозріває, особливо в холодних кліматичних умовах.

Варто відзначити, що він здатен руйнувати різноманітні рослинні структурні сполуки, такі як ксиланази, пектинази, кутинази, ліпази, протеїнази та лаккази. Крім того, гриб може розщеплювати геміцелюлозу до аніонних позаклітинних полісахаридів, розширюючи свою здатність до розкладання різноманітних рослинних матеріалів. [26]

2.2.3. Таксономічний статус *Cryptococcus laurentii*

Філогенетичну класифікацію для *Papiliotrema laurentii* (стара назва *Cryptococcus laurentii*) наведено згідно даних GBIF (Global Biodiversity Information Facility): [29]

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Відділ: *Basidiomycota*

Клас: *Tremellomycetes*

Порядок: *Tremellales*

Родина: *Rhynchogastremaceae*

Рід: *Papiliotrema*

Вид: *Papiliotrema laurentii*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреби населення України у наночастинках срібла для лікування інфекційних захворювань дихальних шляхів

Вірусні захворювання залишаються основною проблемою для здоров'я людини. Вони є причиною більшості спалахів хвороб і пандемій, включаючи лихоманку Ебола, грип, денге, гепатит, лихоманку Чікунгунья та коронавірус 2019 року (COVID-19). Деякі коронавіруси людини (HCoV) відрізняються здатністю викликати епідемії або пандемії, а відповідні захворювання характеризуються важкими респіраторними захворюваннями. Постійна резистентність, мутації та повторні появи штамів вірусів у вірулентних формах обмежують ефективність більшості противірусних препаратів. Наночастинки срібла довели свою ефективність у противірусній дії, показавши вищу ефективність, ніж багато противірусних препаратів, під час дослідження проти ряду вірусних захворювань, включаючи COVID-19 [30,31].

На ринку України представлені наступні препарати з наночастинками срібла (табл 3.1):

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		. Дячишина А. В.			Літ..	Арк..	Аркуші
Перевір.						23	
Реценз.		Скроцька О.І.			24		
Н. Контр. Н.					БТ-4-2		
Затверд.		Стабніков В.П.					

**Препарати, що містять наночастки срібла, представлені на ринку
України**

Назва засобу	Форма випуску	Кількість діючої речовини (срібло)	Виробник	Джерело
Дефлю Сільвер	краплі назальні	45-55 мг/л	Delta Medical (Швейцарія)	[32]
Нокспрей Сільвер	спрей назальний	1,25 мг/л	Sperco (Іспанія)	[33]
Колдисепт Наносільвер	спрей назальний	15 мг/л	Arkona (Польща)	[34]
Сінумікс Аква	спрей назальний	45-55 мг/л	Фітопродукт (Україна)	[35]

З часу реєстрації на території України першого випадку COVID-19 (з 03 березня 2020 року по 31 грудня 2022 року) загалом зареєстровано 5,3 млн підтверджених випадків захворювання, з яких, станом на лютий 2022 року припадає близько 250 тис. випадків [36]. У результаті досліджень виявилось, що наночастинки срібла в концентрації 100 мкг/мл, введені шляхом інгаляції, здатні повністю пригнічувати активність патогенних мікроорганізмів і вірусів дихальних шляхів [37]. Загальний курс застосування становить 5-10 днів, припустимо, курс лікування становить 7 днів, 2 мл на добу, тобто 1400 мкг наночасток срібла. Узагальнюючи все вищенаписане, маємо (табл 3.2):

Таблиця 3.2

Група пацієнтів	Доза препарату на добу, мл	Вміст наночасток срібла в дозі препарату на добу, мкг	Тривалість прийому, діб	Кількість наночасток срібла на 1 людину, мкг	Кількість хворих в Україні станом на лютий 2022 року, тис. осіб	Загальна кількість наночасток срібла на всіх хворих, г
Особи, уражені інфекціями верхніх дихальних шляхів	2	200	7	1400	250	350

Отже, відповідно до таблиці 3.2, місячна норма споживання наночастинок срібла для лікування хвороб дихальних шляхів дорівнює 350 г.

1.2. Розрахунок потужності виробництва наночастинок срібла

На підставі проведених розрахунків (див. п. 3.1) встановлено, що місячна потреба в наночастинках срібла для терапії інфекційних захворювань дихальних шляхів становить 350 г.

Оскільки на українському ринку вже існують противірусні та протимікробні препарати, а процес включення нових ліків до стандартних схем лікування є досить складним, пропонується забезпечити препаратом на основі наночастинок срібла 1% пацієнтів. Таким чином, нам необхідно виробляти саме таку кількість речовини:

$$G_{\text{гп}} = \frac{350 \cdot 1}{100} = 3,5 \text{ г}$$

Для подальших розрахунків необхідно врахувати наступні дані:

1) Для біогенного синтезу використовують супернатант *Cryptococcus laurentii* [38]. З 1 літра культуральної рідини отримують 950 мл супернатанту.

2) Наночастинки срібла складаються з відновленого срібла (Ag^0) та біологічно активних речовин, таких як стабілізуючі білки, полісахаридів та інших. Прийmemo, що близько 30% у наночастинках срібла складає Ag^0 та 70% інші компоненти. Нам потрібно отримати 3,5 г наночастинок срібла, з них 1,05 г буде чисте Ag^0 .

3) Розрахуємо необхідну кількість супернатанту *Cryptococcus laurentii* для отримання 1,05 г срібла у наночастинках:

1М $\text{AgNO}_3 = 169,87$ г/л, а у нас необхідно використовувати 1 мМ AgNO_3 . Тобто на на 1 л супернатанту 0,1699 г/л AgNO_3 . Молярна маса Ag 107,86 г, отже 1 мМ розчин AgNO_3 містить 0,107 г срібла. Враховуючи, що біоредукція срібла становить максимум 30 %, знаємо що з 0,107 г Ag відновиться всього 0,0321 г срібла. Враховуючи вище сказане, нам для біосинтезу наночастинок срібла, в яких міститиметься 1,05 г Ag^0 необхідно використати 32,7 мМ AgNO_3 , а отже 32,7 літрів супернатанту *Cryptococcus laurentii*.

4) Прийmemo, що при виділенні та очистці AgNPs втрати складатимуть 40%, отже нам необхідно 54,5 літрів супернатанту *Cryptococcus laurentii*. Отже нітрату срібла необхідно взяти 54,5 мМ

5) З 1 літра культуральної рідини *Cryptococcus laurentii* отримують 950 мл супернатанту. Отже, для отримання 54,5 л супернатанту необхідно 57,4 л культуральної рідини *Cryptococcus laurentii*.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Беручи до уваги втрати в процесі виділення, з метою забезпечення місячної потреби населення у наночастинках срібла, отримаємо 57,4 л культуральної рідини.

Розраховуємо кількість культуральної рідини за цикл ферментації. Кількість трудоднів приймаємо 30, розраховуємо кількість продукту на добу:

$$V_{\text{д}} = \frac{V_{\text{гп}}}{T_{\text{тр}}} = \frac{57,4}{30} = 1,9 \text{ л}$$

Кількість продукту за один цикл ($V_{\text{кр}}$) становить:

$$V_{\text{кр}} = \frac{K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,1 \times 1,9 \times 24}{24} = 2,09 \text{ л/цикл,}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$); $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає в себе тривалість виробничого біосинтезу (24 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).

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

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для отримання 2,09 літрів кінцевого продукту (культуральної рідини) за один цикл, необхідно врахувати втрати через краплевинос у системі вентиляції, які становлять 10%. Тому об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері буде становити:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 2,09 / (1 - 0,1) = 2,32 \text{ л}$$

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

Обравши коефіцієнт заповнення ($K_{\text{зап}} = 0,6$), розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$):

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб}} / K_{\text{зап}} = 2,32 / 0,6 = 3,86 \text{ л}$$

Приймемо найближчий за об'ємом стандартний ферментер: $V_{\text{сф}} = 4 \text{ л}$ та

уточнимо, прийнятий нами раніше, коефіцієнт заповнення:

$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб}} / V_{\text{сф}} = 2,32 / 4 = 0,58$ л, – не перевищує заданого значення, що свідчить про правильний вибір геометричного об'єму ферментера.

Частка інокуляту від об'єму живильного середовища складає 10%. Для засіву $V_{\text{роб}} = 2,32$ л середовища необхідно приготувати:

$$V_{\text{пм}} = V_{\text{роб}} \cdot X_{\text{ф}} = 2,32 \cdot 0,1 = 0,23 \text{ л посівного матеріалу.}$$

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

Таким чином, кількість поживного середовища у апараті складатиме:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{роб}} - V_{\text{пм}} = 2,32 - 0,23 = 2,09 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм}} = 0,23$ л (230 мл) для засіву ферментера можна здійснити шляхом культивування дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби з об'ємом 750 мл, заповнюючи їх не більше, ніж на 20% ($K_{\text{зк}} = 0,2$). В такому разі слід використати:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 230 / (750 \cdot 0,2) = 1,53 = 2 \text{ колби.}$$

Відповідно до розрахованих даних, для біосинтезу наночастинок срібла дріжджами *Cryptococcus laurentii* BNM 0525 необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 4 л та 2 качалочні колби об'ємом 750 мл.

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки інокуляту та виробничого культивування

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$, л	Уточнений об'єм культуральної рідини, $V_{роб}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, л
II	2,09	2,32	0,23	2,09	0,6	4
I	0,23	0,23	0,023	0,209	0,2	2 колби об'ємом 750 мл

У результаті проведених розрахунків, посівний матеріал для забезпечення виробничого біосинтезу отримують за один етап.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ *CRYPTOCOCCUS LAURENTII*

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії у поживному середовищі для культивування *Cryptococcus laurentii* (продуцента наночастинок срібла) є глутамат.[39]

На жаль, у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes схему катаболізму глюкози у *Cryptococcus laurentii* не наведено, тому для побудови шляху метаболізму глюкози доцільно обрати філогенетично спорідненого організма – *Cryptococcus gattii*. [40]

Згідно з KEGG катаболізм глутамату у *Cryptococcus gattii* починається з дезамінування глутамату за допомогою ферменту глутаматдегідрогенази [КФ 1.4.1.4]. 2-оксоглутарат конденсується з ацетил-СоА за допомогою ферменту цитратсинтази [КФ 2.3.3.1], утворюючи цитрат. Цитрат ізомеризується в ізоцитрат за допомогою ферменту аконітази [КФ 4.2.1.3]. Ізоцитрат дегідратується в оксалосукцинат за допомогою ферменту ізоцитратдегідрогенази [КФ 1.1.1.42]. Оксалосукцинат декарбоксілюється в α -кетоглутарат за допомогою ферменту оксалосукцинатдекарбоксілази. α -кетоглутарат дегідрогенується в сукциніл-СоА за допомогою ферменту α -кетоглутаратдегідрогенази. Сукциніл-СоА гідролізується в сукцинат і СоА за допомогою ферменту сукциніл-СоА синтетази [КФ 6.2.1.4 6.2.1.5]. Сукцинат окислюється в фумарат за допомогою ферменту сукцинатдегідрогенази [КФ 1.3.5.1]. Фумарат гідратується в малат за допомогою ферменту фумарази [КФ 4.2.1.2]. Малат дегідрогенується в оксалоацетат за допомогою ферменту малатдегідрогенази [КФ 1.1.1.37].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Літ..	Арк..	Аркушів
Розроб.		Дячишина А. В.				30	
Перевір.							
Реценз.		Скороцька О.І.					31
Н. Контр. Н.							БТ-4-2
Затверд.		Стабніков В.П.					

Оксалоацетат декарбоксилюється в піруват за допомогою ферменту піруваткарбоксилази [КФ 4.1.1.49].

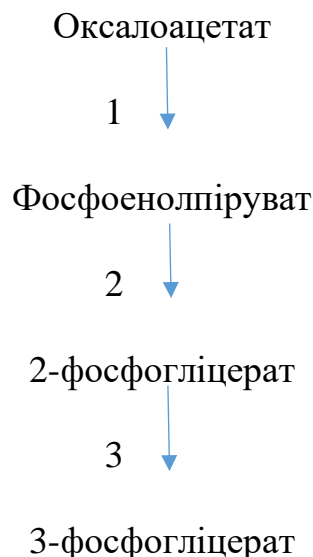
Оксалоацетат декарбоксилюється утворюючи фосфоенолпіруват (ФЕП) за допомогою ферменту фосфоенолпіруваткарбоксикінази [КФ 4.1.1.49]. Енолаза [КФ 4.2.1.11] каталізує перетворення фосфоенолпірувату на 2-фосфогліцерат.

Далі 2-фосфогліцерат за допомогою 2,3-дифосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази [КФ 5.4.2.11] перетворюється на 3-фосфогліцерат, із якого утворюється 1,3-дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази [КФ 2.7.2.3].

1,3-дифосфогліцерат за допомогою ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази [КФ 1.2.1.12] перетворюється у гліцеральдегід-3-фосфат.

За допомогою фруктозодифосфатальдолази [КФ 4.1.2.13] з гліцеральдегід-3-фосфату утворюється фруктозо-1,6-дифосфат.

За участі фруктозо-1,6-дисфосфатази [КФ 2.7.1.11] відбувається утворення фруктозо-6-фосфату, з якої потім відбувається перетворення у глюкозо-6-фосфат за участі ферменту глюкозо-6-фосфатізомерази [КФ 5.3.1.9]. Схема катаболізму глюкози у *Cryptococcus gattii* наведено на рис.1.1.



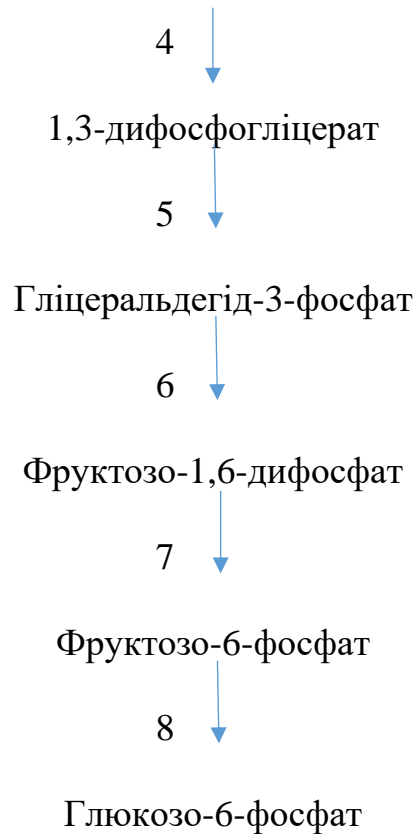


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози у Cryptococcus gattii

Ферменти: 1 – фосфоенолпіруваткарбоксікіназа [КФ 4.1.1.49]; 2 – енолаза [КФ 4.2.1.11]; 3 – 2,3–дифосфогліцерат–залежна фосфогліцератмутаза [КФ 5.4.2.11]; 4 – фосфогліцераткіназа [КФ 2.7.2.3]; 5 – гліцеральдегід–3–фосфатдегідрогеназа [КФ 1.2.1.12]; 6 – Фруктозодифосфатальдолаза [КФ 4.1.2.13]; 7 – 6–фосфофруктокіназа [КФ 2.7.1.11]; 8 – глюкозо–6–фосфатізомераза [КФ 5.3.1.9].

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у біомасу *Cryptococcus laurentii*

Амінокислоти. Білки. Для синтезу триптофаної родини амінокислот та гістидину використовується фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. За допомогою деяких біохімічних реакцій утворюється еритрозо-4-фосфат який потрібен для побудови триптофану та фенілаланіну. Піруват є попередником валіну, лейцину, аланіну та лізину. Серин утворюється з 3- фосфогліцерату, і з першого етапу біохімічних

реакцій також синтезуються цистеїн та гліцин. Оксалоацетат є попередником амінокислот аспартатної родини, таких як аспартат, аспарагін, метіонін, треонін та ізолейцин.

Синтез ліпідів. Дигідроксиацетонфосфат, який утворений з гліцеральдегід-3-фосфату, є початком для синтезу тригліцеридів.

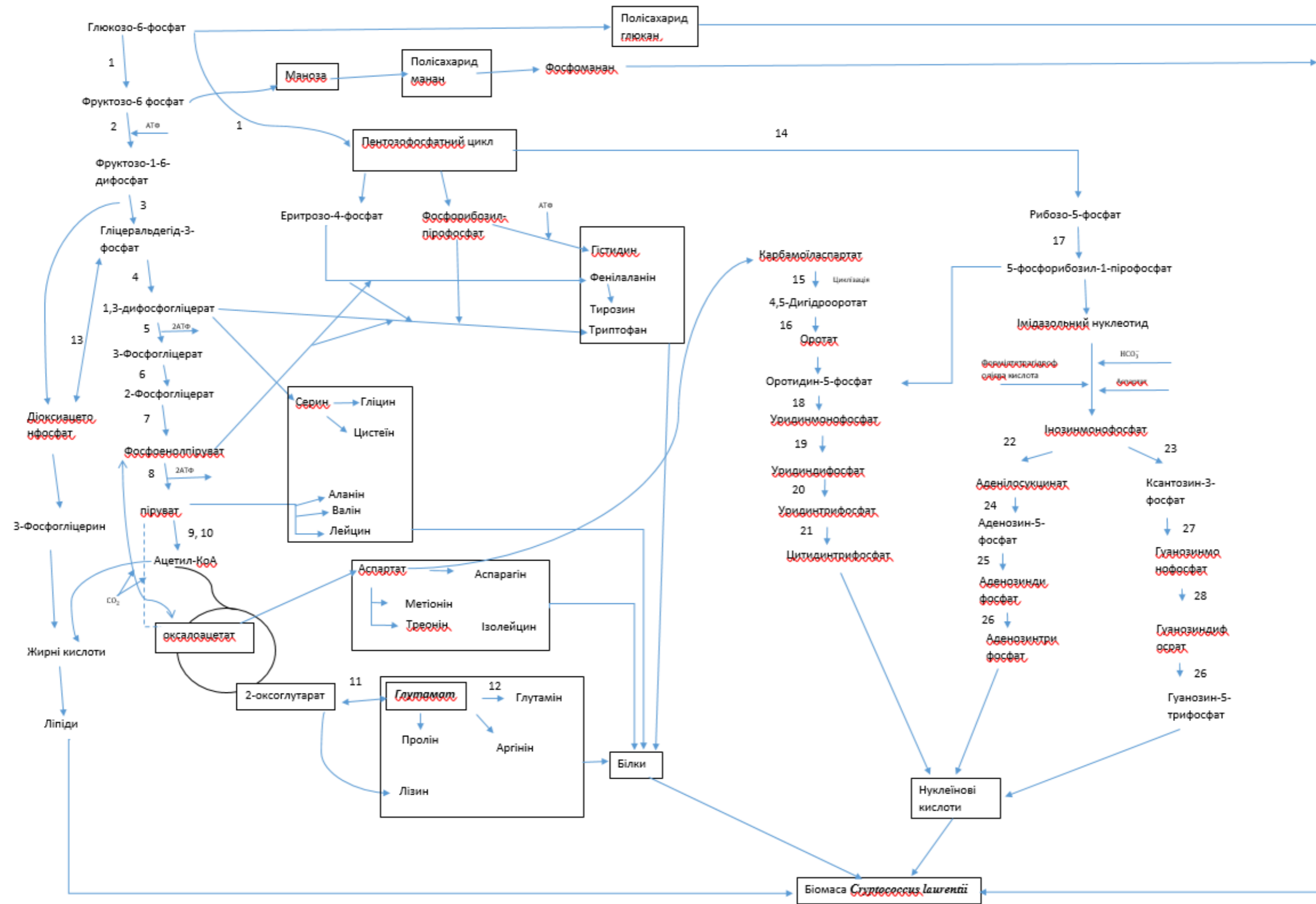
Синтез піримідинових нуклеотидів розпочинається з реакції між карбомоїлфосфатом і аспартатом, яка каталізується ферментом аспартаткарбомоїлтрансферазою [КФ 2.1.3.2]. Після ряду реакцій карбомоїласпартат перетворюється у дигідрооротат, а потім в оротат за участю дигідрооротатдегідрогенази [КФ 3.5.2.3]. Оротат з'єднується з 5-фосфорибозил-1-пірофосфатом, що утворює оротидин-5-фосфат за допомогою оротатфосфорибозилтрансферази [КФ 2.4.2.10]. Оротидин-5-фосфат декарбоксилюється в уридинмонофосфат, а потім перетворюється в уридиндифосфат за участю аденілаткінази [КФ 2.7.4.14]. Завершується цей процес перетворенням уридиндифосфату в цитидинтрифосфат за допомогою цитозинтрифосфат-синтази [КФ 6.3.4.2].

Синтез пуринових нуклеотидів починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, пройшовши ряд реакцій, перетворюється у проміжну сполуку інозинмонофосфат. Інозинмонофосфат може подальше перетворитися на ксантозин-5-фосфат або на аденілосукцинат. Далі, аденілосукцинат перетворюється в аденозин-5-фосфат через аденілосукцинатліазу [КФ 4.3.2.2], а ксантозин-5-фосфат перетворюється в гуанозинмонофосфат за допомогою гуанозинмонофосфат-синтази [КФ 6.3.5.2]. Кінцевий етап - перетворення аденозин-5-фосфату в аденозин-5-дифосфат і гуанозинмонофосфату в гуанозиндифосфат за допомогою нуклеозиддифосфаткінази [КФ 2.7.4.6].

Умовні позначення: ----- — анаплеротичні реакції.
—————> — основний шлях синтезу біомаси.

Ферменти: 1 – глюкозо–6–фосфатізомераза [КФ 5.3.1.9]; 2 – 6–фосфоглюкокіназа [КФ 2.7.1.11]; 3 – Фруктозодифосфатальдолаза [КФ 4.1.2.13]; 4 – гліцеральдегід–3–фосфатдегідрогеназа [КФ 1.2.1.12]; 5 – фосфогліцераткіназа [КФ 2.7.2.3]; 6 – 2,3–дифосфогліцерат–залежна фосфогліцератмутаза [КФ 5.4.2.11]; 7 – енолаза [КФ 4.2.1.11]; 8 – піруваткіназа [КФ 2.7.1.40]; 9 – – піруватдегідрогеназа К1 компонент [КФ 1.2.4.1]; 10 – піруватдегідрогеназа К2 компонент [КФ 2.3.1.12]; 11 – аспаратамінотрансфераза [КФ 2.6.1.1]; 12 – глутамінсинтетаза [КФ 6.3.1.2]; 13 – триозофосфатізомераза [КФ 5.3.1.1]; 14 – рибозо–5–фосфатізомераза [КФ 5.3.1.6]; 15 – дигідрооротаза [КФ 3.5.2.3]; 16 – дигідрооротатдегідрогеназа [КФ 1.3.5.2]; 17 – рибозофосфатпірофосфокіназа [КФ 2.7.6.1]; 18 – оротидин–5– фосфатдекарбоксилаза [КФ 4.1.1.23]; 19 – аденілаткіназа [КФ 2.7.4.14]; 20 – нуклеозиддифосфаткіназа [КФ 2.7.4.6]; 21 – ЦТФ–синтаза [КФ 6.3.4.2]; 22 – аденілосукцинатсинтаза [КФ 6.3.4.4]; 23 – ІМФ дегідрогеназа [КФ 1.1.1.205]; 24 – 1,3–β–глюкансинтаза [КФ 2.4.1.34]; 25 – аденілаткіназа [КФ 2.7.4.3]; 26 – нуклеозиддифосфаткіназа [КФ 2.7.4.6]; 27 – ГМФ–синтаза [КФ 6.3.5.2]; 28 – гуанілаткіназа [КФ 2.7.4.8]

Рис. 1.2. Схема біосинтезу препарату на основі біомаси дріжджового гриба *Cryptococcus laurentii*, починаючи з катаболізму ростового субстрату - глутамату



РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

5.1. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря

C. laurentii BNM 0525 є факультативним анаеробом, отже для забезпечення оптимальних умов росту, для підвищення масообміну в поживному середовищі та для кращого насичення середовища киснем, варто забезпечити можливість безперервної подачі стерильного аераційного повітря у ферментер через барботер [41].

Етап підготовки аераційного повітря має на меті забезпечення чистоти повітря, уникнення проникнення шкідливих мікроорганізмів з навколишнього середовища до основної культури, таким чином уникаючи контамінації. Для отримання повітря, що буде відповідати стандартам що до стерильності, використовується процес фільтрування, за допомогою фільтрів різних рівнів очищення. На висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі здійснюється забір атмосферного повітря. Підготовка повітря проводиться у кілька основних етапів: фільтрування грубої очистки, стиснення повітря, зниження температури та видалення зайвої вологості, корегування термодинамічних показників, очистка на головних фільтрах, використання індивідуальних фільтрів. Завдяки цьому поступовому очищенню, можна досягти стерильності повітря на рівні 99,999%.

Фільтруючи забране повітря через фільтри грубого очищення, вдається відділити більшість часток розміром $\geq 10-5$ мкм, як наприклад пил, пісок, пух, волосся, механічні частки та інші домішки. Ступінь очищення зазвичай складає $E=80\%$. Даний етап очистки має на меті попередню очистку повітря для полегшеного проведення наступних стадій.

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Дячишина А. В.			Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.						36	
Реценз.		Скороцька О.І.			БТ-4-2		
Н. Контр. Н.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Надалі відбувається етап стиснення повітря у турбокомпресорі, наприкінці даного етапу повітря значно нагрівається ($T = 120\text{--}250\text{ }^{\circ}\text{C}$). Водяний теплообмінний апарат використовується для зниження температури повітря, а для видалення надлишку вологи (до 60-70%), повітря надходить у ресивер. Даний процес також сприяє зменшенню пульсації руху повітря, що може бути значною проблемою при подальшій роботі наступних етапів очищення.

Для фінальної стабілізації термодинамічних показників, повітря підігрівається (до 40-45 $^{\circ}\text{C}$) у спеціально виділених теплообмінниках. Вологість складатиме 50%.

За допомогою головних фільтрів, виходить отримати ступінь очищення $E=95\%$. На фінальних стадіях очистки, безпосередньо перед подачею у ферментер, повітря пропускається через індивідуальні фільтри, встановлені індивідуально на кожному ферментері. Таким чином виходить підвищити ступінь очищення до $E=99,999\%$.

Будова фільтрів буде залежати від типу фільтрувального матеріалу, економічно вигідно використовувати фільтри з пористих та волокнистих матеріалів. Важливою є своєчасна стерилізація фільтрів, для унеможливлення контамінації. Найдоречніше стерилізацію проводити методом нагрівання та витримки вологою парою (125-130 $^{\circ}\text{C}$) протягом певного часу, з подальшим висушування гарячим повітрям.

5.2. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.2.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Підготовка виробничих приміщень — один з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти і зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень. Під санітарною підготовкою виробничих приміщень мають на увазі комплекс заходів, що складається з вологого прибирання, дезінфекції й УФ-опромінення, спрямований на досягнення відповідного класу чистоти. Прибирання виробничих приміщень слід проводити щозміни, а генеральне

прибирання — один раз у 5—6 днів або негайно на вимогу бактеріолога. Дезінфекція приміщень і поверхонь обладнання призводить, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40—60 % від їх початкового вмісту. При виборі дезінфікуючої речовини необхідно враховувати не тільки її бактерицидні властивості і спектр дії, але й можливу токсичність для людини [20].

Дезінфекційний засіб "ПРАЙМДЕЗ КОМБІ"

Фірма-виробник – ТОВ «ПРАЙМДЕЗ», Україна за ТУ У 20.2-24923956-002:2020 із сировини виробництва «CHRISTEYNS SA», Франція [21].

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, % (за масою): діючі речовини: N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 5,23–5,77; дідецилдіметиламонію хлорид – 3,15–3,85; допоміжні речовини: додаткові речовини згідно з формулою засобу, вода – до 100%.

Засіб випускають у вигляді концентрованого розчину. Це прозорий розчин, безбарвного до жовтуватого кольору із сосновим запахом. Водневий показник (рН) засобу – 8,8–9,4, густина– 1,049–1,059 г/см³. Засіб добре змішується з водою, його застосовують у вигляді робочих розчинів. Значення рН 0,25%-го робочого розчину засобу близько 8,0. Робочі розчини засобу мають досконалі мийні та дезодоруючі властивості, добре змочують поверхні, ефективно розчиняють і видаляють забруднення будь-якого походження (у тому числі білкові, жирові, залишки крові, лікарських засобів тощо) з поверхонь, малопінні, легко змиваються з поверхонь, не залишають нальоту, не пошкоджують і не знебарвлюють об'єкти, що обробляються, не зменшують міцність тканин. Легкий приємний запах засобу створює відчуття свіжості, прохолодної та здорової атмосфери.

Робочі розчини не викликають корозії об'єктів, виготовлених з алюмінію, міді, латуні, нержавіючої сталі, не пошкоджують поверхні виробів із лакофарбовим і гальванічним покриттям, керамічні поверхні, вироби з граніту, нікелю, титану, тefлону, скла, дерева, поліаміду, поліетилену, поліпропілену, поліуретану, полівінілхлориду, акрилбутадієнстиролу, силікону, нітрилу, акрилового скла інших полімерних матеріалів.

Призначення: засіб призначений для дезінфекції приміщень та поверхонь [21].

Спектр антимікробної дії засобу ПРАЙМДЕЗ КОМБІ:

- бактерицидні властивості, у тому числі щодо *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* *Klebsiella pneumonia*, (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 1040, EN 1276, EN 13697, EN 13727); та ін.
- туберкулоцидні властивості, у тому числі щодо *Mycobacterium tuberculosis hominis*, *Mycobacterium terrae* (атестування згідно з Європейськими стандартами EN 14348, EN 16615);
- фунгіцидні властивості, у тому числі щодо *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis (niger)* (атестування згідно з Європейськими стандартами EN 1275, EN 13624, EN 13697, EN 16615);
- віруліцидної сила всіх оболонкових вірусів, такі як вірус гепатиту В, вірус гепатиту С, ВІЛ, Т-лімфотропний вірус людини, вакциніявірус, вірус контагіозного молюска, коронавірус, герпесвірус, вірус грипу (у тому числі H5N1, H1N1), вірус парагрипу, вірус епідемічного паротиту, респіраторний сенцитіальний вірус, вірус кору та інших оболонкових вірусів, безоболонкових вірусів, таких як поліовірус тип 1, аденовірус тип 5 та інших безоболонкових вірусів. (Атестування згідно з Європейськими стандартами (EN 14476, EN 16777, EN 14885);
- спороцидні властивості, у тому числі щодо *Bacillus subtilis*.

Токсичність та безпечність: за параметрами гострої токсичності, згідно з класифікацією, що надана Наказом МОЗ № 1596 від 14.07.2020, у концентрованому вигляді при попаданні у шлунок і нанесенні на шкіру належить до помірно небезпечних речовин (3-й клас небезпеки). Засіб у вигляді концентрату лагодити місцеву подразнювальну дію на шкіру і слизові

оболочки очей, при інгаляційному надходженні може викликати роздратування дихальних шляхів. Робочі розчини дезінфекційного засобу класифікують як помірно і малонебезпечні. При їх попаданні на шкіру та слизові оболонки очей. Складові компоненти засобу не виявляють сенсibilізуючих властивостей. При одноразовому попаданні на шкіру робочі розчини не чинять місцевої подразнювальної дії, але можуть подразнювати верхні дихальні шляхи при застосуванні їх способом зрошування у разі перевищення норми витрати засобу. Засіб не має сенсibilізуючих властивостей, мутагенного та канцерогенного впливу, не впливає на репродуктивну функцію [21].

Приготування робочих розчинів

Робочі розчини засобу ПРАЙМДЕЗ КОМБІ готують у промаркованій емальованій (без пошкоджень), скляній або пластмасовій тарі, яка закривається кришкою. Спершу наливають холодну або теплу (не вище 60°C) воду. Потім додають необхідну кількість концентрату. Ретельно перемішують та додають воду до необхідного обсягу [21].

Для зручності приготування робочих розчинів можна використовувати:

- дозовані флакони на 20 мл засобу. Розчиняючи 1 флакон у 8 л води, одержують робочий розчин із концентрацією 0,25 %;
- вбудовані дозуючі пристрої на 30 мл у флаконах місткістю 1 л, градуйовані по 10, 20, 30 мл.

Поверхні приміщень (підлога, стіни, двері, тверді меблі тощо), поверхні приладів, устаткування, діагностичного обладнання та ін. обробляють робочим розчином **концентрацією 0,25%**, згідно даних інструкції до застосування.

Для отримання 10 л розчину концентрацією 0,25% потрібно 25 мл концентрату розчинити в 9975 мл води.

Розрахунки для приготування робочих розчинів засобу ПРАЙМДЕЗ
КОМБІ [21]

Концентрація робочого розчину (за засобом), %	Об'єм розчину, л							
	1,0		5,0		8,0		10,0	
	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл
0,25	2,5	97,5	12,5	987,5	20,0	980,0	25,0	975,0
0,4	4,0	96,0	20,0	980,0	32,0	968,0	40,0	960,0
0,5	5,0	95,0	25,0	975,0	40,0	960,0	50,0	950,0
4,0	40,0	60,0	200,0	760,0	320,0	680,0	400,0	600,0

Поверхні приміщень, медичних приладів, обладнання, апаратури та інших об'єктів дезінфікують методом протирання із застосуванням тканин чи нетканих серветок, що просочені робочим розчином засобу, або методом зрошення із застосуванням різних типів розпилювачів (у тому числі аерозольних розпилювачів з ультразвуковими насадками). Продезінфіковані поверхні не потребують промивання водою, за винятком поверхонь, які контактуватимуть із харчовими продуктами. Норму витрати працюючого доводять до норми протирання - 80–100 мл/м².

Термін придатності робочих розчинів – 5 діб за умови зберігання у щільно закритій промаркованій тарі за кімнатної температури. Допускається багаторазове використання робочих розчинів для дезінфекції, достерилізаційного очищення, сумісних процесів дезінфекції та достерилізаційного очищення протягом терміну придатності робочих розчинів, якщо їх зовнішній вигляд не змінився. За перших ознак зміни

зовнішнього вигляду (зміна кольору або запаху, поява облогу, помутніння) розчин необхідно замінити.

Пакування: ПРАЙМДЕЗ КОМБІ випускають у дозованих флаконах по 20 мл, пластикових флаконах по 1 л з дозуючим пристроєм, каністрах по 5 л. За домовленістю із замовником асортимент пакування може бути змін або доповнень.

Термін та умови зберігання: Термін придатності до засобів ПРАЙМДЕЗ КОМБІ – 3 роки з дати виготовлення. Термін придатності засобу після відкриття упаковки – 3 роки з дати виготовлення за умови дбайливого закривання упаковки після шкірного застосування. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці за температури від +5 до +40 °С у сухому, добре провітрюваному приміщенні, у недоступних для дітей місцях. Заборонено використовувати засіб після закінчення терміну придатності [21].

Дезінфекційний засіб ДДМ ЕКО (DDM ECO)

Фірма-виробник – Laboratoires ANIOS (Франція).

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: діючі речовини: дидецилдиметиламоній хлорид – 3,19-3,86; допоміжні речовини: детергенти, інші допоміжні речовини, вода – до 100 [22].

Засіб ДДМ ЕКО – прозорий розчин, без кольору, із незначним запахом, густина концентрату (20°C) – 1,05-1,09 г/см³, індекс рефракції (20°C) – 1,36-1,38, рН концентрату (20°C) > 12,0; рН 1% розчину засобу (20°C) – приблизно 11,7. Засіб добре змішується з водою. Водні розчини прозорі, без запаху. Робочі розчини засобу дезінфікують та миють під час однієї технологічної операції, добре розчиняють та видаляють при кімнатній температурі білкові, жирові забруднення, залишки крові, лікарських засобів тощо, легко змиваються.

Призначення: засіб призначений для дезінфекції приміщень та поверхонь.

Спектр антимікробної дії. Засіб ДДМ ЕКО має [22]:

- бактерицидні властивості, у т. ч. по відношенню до *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, збудників лістеріозу, сальмонельозу; а також штамів, резистентних до антибіотиків, включаючи MRSA/ЕНЕС та ін. (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 1040, EN 1276, EN 13697);
- віруліцидні властивості по відношенню до збудників вірусного гепатиту В;
- фунгіцидні властивості, у т. ч. по відношенню до грибів роду *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton* та ін. (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 1275, EN 1650, EN 13697).

Токсичність та безпечність: Засіб ДДМ ЕКО за параметрами гострої токсичності при введенні в шлунок належить до 3 класу помірно небезпечних речовин, при нанесенні на шкіру до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки). Концентрат засобу може викликати подразнення, почервоніння, опіки шкіри та подразнення слизових оболонок очей. Робочі розчини при одноразовому попаданні на шкіру не виявляють місцево-подразнюючої дії. Складові речовини засобу не мають сенсibilізуючих та резорбтивних властивостей, не кумулюють, не виявляють канцерогенних, мутагенних властивостей, не спричиняють негативної дії на репродуктивність. Робочі розчини засобу ДДМ ЕКО класифікуються як безпечні для здоров'я людей згідно з Європейськими директивами 1999/45/ЄС, 67/548/ЄЕС та ЕС1272/2008, які стосуються регламентації правил класифікації, пакування та маркування небезпечних препаратів і речовин [22].

Приготування робочих розчинів

Робочі розчини засобу ДДМ ЕКО готують розведенням концентрату у воді (не вище 30°C) при перемішуванні. Розчини готують у промаркованій емальованій (без пошкоджень), скляній або пластмасовій тарі, яка закривається кришкою.

Розрахунки для приготування робочих розчинів засобу ДДМ ЕКО [22]

Концентрація робочого розчину (за препаратом), %	Об'єм розчину, л			
	1,0		8,0	
	кількість концентрату, мл	кількість води, мл	кількість концентрату, мл	кількість води, мл
0,25	2,5	997,5	20,0	7980,0
0,5	5,0	995,0	40,0	7960,0
1,0	10,0	990,0	80,0	7920,0
2,0	20,0	980,0	160,0	7840,0
3,0	30,0	970,0	240,0	7760,0

Поверхні приміщень (підлога, стіни, двері, тверді меблі тощо), а також обладнання та апарати зі скла, гуми, металів та полімерних матеріалів обробляють робочим розчином в концентрації від 0,25 до 2%, згідно даних інструкції до застосування. Оберемо оптимальну **концентрацію 0,5%**.

Для отримання 8 л розчину концентрацією 0,5% потрібно 40 мл концентрату розчинити в 7960 мл води.

Термін придатності підготовлених робочих розчинів – 7 діб за умови зберігання у промаркованій тарі із закритою кришкою. Робочі розчини засобу використовують з метою дезінфекції, очищення та миття одноразово.

Пакування: засіб ДДМ ЕКО випускають у пластикових каністрах по 5 л, пластикових каністрах по 25 л.

Термін та умови зберігання: термін придатності засобу ДДМ ЕКО – 3 роки з дати виготовлення. Після відкриття упаковки, засіб не втрачає своїх властивостей до кінця терміну зберігання за умови ретельного закриття після кожного використання. Зберігати в оригінальній упаковці у приміщеннях, які добре провітрюються, при температурі від +5°C до +35°C в недоступних для

дітей місцях. Уникати замороження. Забороняється використання засобу після закінчення терміну придатності [22].

Обладнання, що використовується при виробництві проміжної продукції та активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), має бути належним чином спроектоване, мати відповідні розміри і розташовуватися відповідно до свого призначення і таким чином, щоб персонал міг здійснювати очищення, санітарну обробку (за необхідності) і технічне обслуговування [23].

Слід встановити графіки й процедури (із призначенням відповідальних осіб) проведення профілактичного технічного обслуговування обладнання. Необхідно розробити письмові методики очищення обладнання і подальшого отримання дозволу на його використання при виробництві проміжної продукції та АФІ. Процедури очищення мають бути описані досить детально, щоб оператори могли проводити очищення обладнання будь-якого типу відтворюваним та ефективним способом. Ці методики мають включати [23]:

- призначення особи, відповідальної за очищення обладнання;
- графіки очищення, включаючи (за необхідності) графіки санітарної обробки;
- повний опис методів і матеріалів, включаючи розведення миючих засобів, що використовуються для очищення обладнання;
- інструкції з розбирання і збирання кожної (за необхідності) одиниці обладнання для забезпечення належного очищення;
- інструкції з видалення або затушовування маркування попередньої серії;
- інструкції із захисту чистого обладнання від контамінації перед його використанням;
- інспектування обладнання щодо чистоти безпосередньо перед використанням, якщо це практично можливо;
- встановлення (за необхідності) максимального проміжку часу між завершенням процесу й очищенням обладнання.

Обладнання і приладдя слід очищати, зберігати і при необхідності піддавати санітарній обробці або стерилізувати для запобігання контамінації або перенесенню матеріалу, які можуть змінити якість проміжної продукції та АФІ понад межі, встановлені в офіційних або інших специфікаціях.

Слід встановити й обґрунтувати критерії прийнятності щодо залишків, а також вибору процедур очищення та миючих засобів. Обладнання має бути чітко ідентифіковане щодо його вмісту і статусу чистоти за допомогою відповідних засобів [23].

Миючий засіб Бодедекс® форте (Bodedex® forte)

Фірма-виробник – BODE Chemie GmbH&Co.KG (Німеччина) [24].

Склад засобу вміст діючих та допоміжних речовин, мас%:

Діючі речовини: 1,2-пропандіол – 10,0-20,0; ізотридеканолетоксилат (7EO) – 5,0-10,0; лаурил міристилалкогольетоксилат – 5,0-10,0;

Допоміжні речовини: аніонні та амфотерні поверхнево-активні речовини, інгібітори корозії, консервант, вода до 100,0.

Рідкий концентрат. Прозора рідина жовтуватого кольору без запаху. Показник заломлення 1,370 – 1,380 (20°D). Густина 1,046 – 1,056 г/см³ (20°С). Добре розчиняється у воді. Значення рН концентрату – 7,5 – 8,5; 1,0%-го розчину – 7,0. Температура займання >100°С. Продукт не є вибухонебезпечним та самозаймистим. Засіб не має корозійних властивостей щодо виробів із нержавіючої сталі, алюмінію, міді, латуні, не пошкоджує вироби зі скла, натуральної гуми, синтетичних матеріалів. Засіб містить компоненти, що компенсують жорсткість води та надійно розчиняють біологічні забруднення.

Призначення: для розчинення органічних забруднень, миття поверхонь та обладнання, у тому числі достерилізаційного очищення [24].



Рис. 5.1. Засіб Бодедекс® форте (Bodedex® forte) [24].

Специфічні біологічні властивості: виявляє змочувальні, мийні, емульгуючі властивості, видаляє білкові, жирові забруднення, залишки крові (навіть затверділі), секретів, рентгеноконтрастних речовин, лікарських та дезінфекційних засобів з поверхні виробів медичного призначення, легко змивається з оброблених поверхонь, не залишає нальоту. Завдяки нейтральному рН-показнику Бодедекс форте не ушкоджує поверхню матеріалів. Ця властивість посилюється дією спеціальної комплексноутворюючої системи, яка компенсує дію жорсткості води.

Токсичність та безпечність засобу: за параметрами гострої токсичності засіб Бодедекс® форте згідно з ГОСТ 12.1.007-76 при введенні в шлунок та нанесенні на шкіру належить до 3 класу помірно небезпечних речовин. Концентрат та робочі розчини засобу належать до мало токсичних речовин. Концентрат подразнює шкіру та слизові оболонки очей. Віддалені токсичні ефекти відсутні, засіб не внесений до переліку контактних алергенів [24].

Приготування робочих розчинів

Робочі розчини засобу Бодедекс® форте готують шляхом розведення у водопровідній воді кімнатної температури при періодичному перемішуванні у

промаркованій тарі з будь-яких матеріалів, яка щільно закривається кришкою [24].

Обладнання піддають очищенню робочим розчином в **концентрації 0,5%**, згідно даних інструкції до застосування. При такій концентрації експозиція складає 10 хв. Для отримання 10 л розчину концентрацією 0,5% потрібно 50 мл концентрату розчинити в 9950 мл води.

Термін придатності робочого розчину засобу – 1 доба за умови зберігання у закритій кришкою промаркованій тарі з будь-яких матеріалів.

Пакування: Бодедекс® форте випускають по 500 мл у пластиковому флаконі, 2 л у пластиковій каністрі, 5 л у пластиковій каністрі, 500 мл у пластиковому флаконі № 20 in bulk, 2 л у пластиковій каністрі №4 in bulk, 5 л у пластиковій каністрі №128 in bulk, 200 л у пластиковій діжці in bulk.

Термін та умови зберігання засобу: термін придатності засобу – 3 роки. Не потребує спеціальних умов зберігання. Зберігати в щільно закритій упаковці виробника у приміщеннях, які добре провітрюються, захищених від дії прямих сонячних променів, при температурі від +5 до +25°C в недоступних для дітей місцях [24].

Миючий засіб КОРЗОЛЕКС ® ЕКСТРА (KORSOLEX ® EXTRA)

Фірма-виробник – BODE Chemie GmbH (Німеччина) [25].

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас %:

- діючі речовини: (етилендіоксид)диметанол – 14,5-16,1; глутаровий альдегід – 7,1-7,9; бензалконій хлорид – 0,9-1,1; дидецилдиметиламоній хлорид – 0,9-1,1;
- допоміжні речовини: детергенти, розчинники, інгібітори корозії, регулятори піноутворення, барвник, ароматизатор, вода – до 100,0.

Засіб являє собою рідкий концентрат; прозору рідину блакитного кольору, рН концентрату – 3,5-4,5, рН робочих розчинів з концентрацією 2,0-3,0 % ~ 6,0. Засіб добре розчиняється у воді. Робочі розчини мають досконалі мийні властивості, добре змиваються, не пошкоджують вироби з нержавіючої сталі, кольорових металів (в тому числі алюмінію), скла, порцеляни, кераміки,

ебоніту, синтетичних матеріалів, гуми (в тому числі латексу та силікону), а також з полімерних матеріалів (в тому числі макролону та плексигласу) тощо. Не сумісний з милами та аніонними поверхнево-активними речовинами. Засіб не є вибухонебезпечним та самозаймистим.

Призначення: для миття поверхонь та обладнання, у тому числі достерилізаційного очищення [25].

Засіб КОРЗОЛЕКС ® ЕКСТРА має:

- бактерицидні властивості, у т. ч. по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Helicobacter pylori*, антибіотикорезистентних бактерій та ін.;
- спороцидні властивості, у тому числі по відношенню до *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracoides*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*;
- туберкулоцидні властивості, атестований по відношенню до *Mycobacterium terrae* згідно з Європейськими стандартами EN 14348, EN 14563 та випробуваний відповідно до методик DGHM;
- мікобактерицидні властивості, атестований по відношенню до *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium terrae* згідно з Європейськими стандартами EN 14348, EN 14563 та випробуваний відповідно до методик DGHM;
- фунгіцидні властивості, атестований по відношенню до грибів роду *Candida*, *Aspergillus* та ін. згідно з Європейськими стандартами EN 13624, EN 14562 та випробуваний відповідно до методик DGHM;
- віруліцидні властивості, у т. ч. по відношенню до збудників вірусних гепатитів А, В та С, ВІЛ-інфекції, вірусу Ебола, адено-, поліома-, рота-, поліо-, вакциніявірусів та ін [25].

Токсичність та безпечність засобу: за параметрами гострої токсичності згідно з ГОСТ 12.1.007-76 при введенні в шлунок належить до 3-го класу помірно небезпечних речовин, при нанесенні на шкіру до 4-го класу

малонебезпечних речовин. Концентрат засобу подразнює шкіру, слизові оболонки очей та верхніх дихальних шляхів, має слабкі сенсibiliзуючі властивості. Віддалені токсичні ефекти невідомі. Засіб біологічно розпадається [25].

Приготування робочих розчинів

Робочі розчини КОРЗОЛЕКС ® ЕКСТРА готують шляхом розведення в холодній воді при перемішуванні. Розчин готують у промаркованій тарі з будь-яких матеріалів, яка щільно закривається кришкою [25].

Обладнання піддають достерилізаційному очищенню робочим розчином в **концентрації 0,25%**, згідно даних інструкції до застосування. Для отримання 10 л розчину концентрацією 0,5% потрібно 25 мл концентрату розчинити в 9975 мл води.

Термін придатності робочих розчинів – 7 діб за умови зберігання у промаркованій тарі з будь-яких матеріалів із закритою кришкою. Робочі розчини можуть використовуватись багаторазово протягом 7 діб. При перших ознаках зміни зовнішнього вигляду (зміна кольору, поява осаду, помутніння, зміна запаху) розчин необхідно замінити. Невикористані робочі розчини КОРЗОЛЕКС ® ЕКСТРА можуть зберігатися до 28 днів в закритій ємкості.

Пакування: КОРЗОЛЕКС ® ЕКСТРА випускають у пластикових флаконах по 2,0 л та у пластикових каністрах по 5,0 л. За домовленістю із замовником асортимент пакування може бути змінений або доповнений.

Термін та умови зберігання: термін придатності засобу – 3 роки. Зберігати в щільно закритій упаковці виробника в приміщеннях, що добре провітрюються, при кімнатній температурі в недоступних для дітей місцях. Уникати попадання прямих сонячних променів, високої температури [25].

5.2.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва наночастинок срібла

Для біосинтезу наночастинок срібла дріжджами *Cryptococcus laurentii* BNM 0525 необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 4 л та 2

качалочні колби об'ємом 750 мл. Допоміжна апаратура (реактори, збірники) у даному випадку не потрібні.

Виробничий біосинтез наночастинок срібла буде проходити в наступних виробничих приміщеннях - цех культивування, лабораторне приміщення, в якому розміщено автоклави, лабораторний бокс, холодильники, термостати, а також обладнання апарати для контролю основних показників виробництва наночастинок срібла.

В ході розробки плану виробничих приміщень враховують розміри ферментера для культивування. Приймаємо, що з трьох сторін відстань від ферментера до стін буде по 2 м, а з боку дверей – 3 м від стіни.

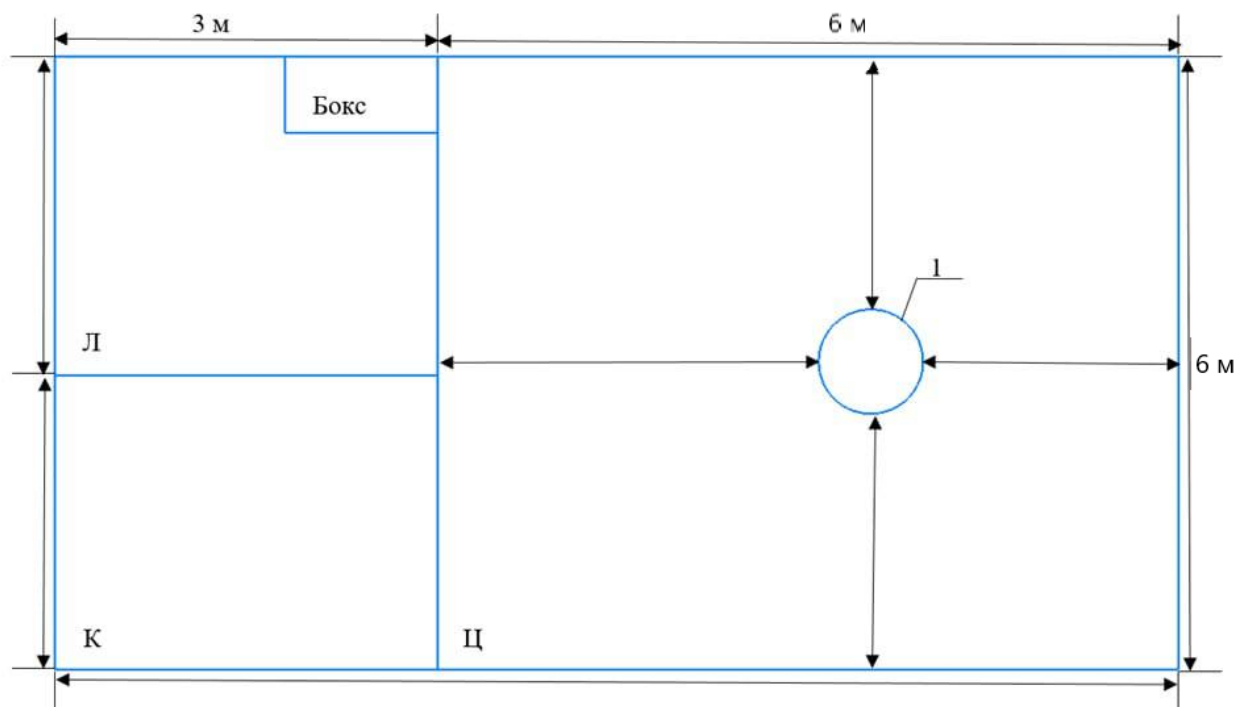


Рис. 2.3. Схематичне зображення плану приміщень для біосинтезу наночастинок срібла дріжджами *S. laurentii* BNM 0525. Ц - цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту; 1 – ферментер об'ємом 4 л (ФР-8); Л – лабораторне приміщення; К – приміщення з качалками.

Схематичне зображення плану організації цеху, лабораторії та приміщення з качалками для біосинтезу наночастинок срібла дріжджами *S. laurentii* BNM 0525 представлено на рис. 2.3.

**Габаритні розміри обладнання для виробництва наночастинок
срібла**

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	4	0,81	1,56
Всього	4		

За інформацією з таблиці 5.3, загальний об'єм обладнання для миття становитиме всього 4 л.

При розрахунку кількості культуральної рідини за цикл ферментації було прийнято, що виробництво будуть проводити протягом 30 трудоднів. На виробництві завжди мають бути дотримані санітарно-гігієнічні умови, тому миття підлоги проводиться кожного дня, тобто 30 разів. Щомісяця проводять генеральне прибирання, що передбачає миття стін, підлоги, вікон тощо, тому на 30 днів прибирання проводять 1 раз. Для розрахунку кількості мийних засобів необхідно розрахувати приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, із врахуванням площі підлоги приміщень та площі стін на висоту. Для розрахунків приймаємо миття стін виробничих приміщень на висоту 2,5 м.

Площа підлоги цеху виробничого культивування становить 27,9 м² (5,81×4,81 м), площа стін становить – [(5,81× 2,5) + (4,81 × 2,5)] × 2 = (14,52+ 12,02) × 2 = 53,08 м², тоді загальна площа для миття буде 27,9 + 53,08 = 80,98 м². Узагальнені розрахунки площ приміщень подано в таблиці 5.4.

**Розрахунки площі стін та підлоги приміщень для отримання
наночастинок срібла**

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	27,9	53,08	80,98
Лабораторне приміщення	7,5	27,5	35
Приміщення з качалками	6,93	26,54	33,47
Загальна площа	42,33	107,12	149,45

З метою забезпечення місячної потреби населення у наночастинках срібла потрібно отримати 57,4 л культуральної рідини. Кількість продукту за один цикл становить 2,09 л. З урахуванням цього дізнаємось кількість виробничих циклів:

$$57,4 / 2,09 = 27 \text{ циклів.}$$

Підготовку обладнання здійснюють перед кожним циклом, після останнього циклу проводять додаткове миття. Тому кількість процесів миття за весь період виробництва складатиме 28. Загальний об'єм обладнання, яке підлягатиме миттю, становить:

$$4 \times 28 = 0,112 \text{ м}^3$$

В таблиці 5.5 представлено розрахунки площ оброблюваних об'єктів на виробництві наночастинок срібла за весь період.

Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період виробництва наночастинок срібла

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	4	28	112
Підлога	42,33	30	1 269,9
Стіни, двері, вікна	107,12	1	107,12

Миття обладнання буде проходити за допомогою циркуляційної СІР-мийки з використанням СІР-станції [26]. За використання автоматичного миття обладнання витрата робочого розчину миючого засобу складе 20% від об'єму обладнання. Тому розрахуємо скільки засобу піде на миття 112 м³ обладнання:

$$0,112 \times 0,2 = 0,022 \text{ м}^3 \text{ засобу на 30 днів виробництва}$$

В таблиці 5.6 представлено розрахунки щодо підібраних мийних та дезінфікувальних засобів, що будуть використовуватись для підготовки приміщень й обладнання для біосинтезу наночастинок срібла. Для розрахунку дезінфектантів було прийнято витрату робочого розчину деззасобу 100 мл на кожні 1 м² поверхні.

Таблиця 5.6

Розрахунки мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва наночастинок срібла

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
ПРАЙМДЕЗ КОМБІ ¹	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,25	1 377,02	137,7	550	1,37	188,65
ДДМ ЕКО ²	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,5	1 377,02	137,7	277	1,38	190,02
Бодедекс форте ³	Обладнання	0,5	0,022	22	486	2,43	53,46
КОРЗОЛЕКС ЕКСТРА ⁴	Обладнання	0,25	0,022	22	700	1,75	38,5

1 - https://ametyst24.com.ua/ua/p2094275827-prajmdez-kombi.html?srsId=AfmBOopPpO8BT3zldV36gLf7_rMjoPdf1mnUUePg1lqN56K4cep1CoYx

2 - <https://dezsredsva.ub.ua/goods/view/21228019/all/ddm-eko-5-1/>

3 - https://medkvartal.com.ua/bodedeks-forte-51?gclid=EAJaIQobChMIu5HOp8LtjAMVwFiRBR0PVjHdEAQYBSABEgJx3fD_BwE

4 - https://kmm.com.ua/shop/ob_medicina/dezinfektsiya/korzoleks-ekstra-5-1/

Таким чином, вартість дезінфікуючих засобів ПРАЙМДЕЗ КОМБІ та ДДМ ЕКО є майже однаковою і відрізняється всього на 1,37 грн. Рекомендується чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1-3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких форм мікроорганізмів. Тому будемо використовувати обидва засоби для підтримання чистоти приміщень і поверхонь на біотехнологічному виробництві наночастинок срібла.

Що стосується миючих засобів для обладнання, то більш вигідним є використання засобу КОРЗОЛЕКС ЕКСТРА, оскільки він використовується у меншій концентрації та має майже удвічі меншу вартість. Після миття та обполіскування обладнання буде піддаватись стерилізації, що забезпечуватиме його дезінфекцію.

5.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *Cryptococcus laurentii* BNM 0525

За попередньо розрахованими даними, виробниче культивування *C. laurentii* BNM 0525, для подальшого біосинтезу наночастинок срібла, буде проходити у ферментері об'ємом 4 л з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу проходитиме у 1 етап: вирощування в колбах на качалці об'ємом 750 мл.

Для виробничого біосинтезу наночасток срібла *C. laurentii* BNM 0525 використовується середовище такого складу (г/л):

- ❖ Казеїновий пептон – 17,5;
- ❖ Яловичий екстракт – 2;
- ❖ Кукурудзяний крохмаль – 1,5.

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту та особливості приготування компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту та виробничого культивування

Об'єм середовища, л	Яловичий екстракт	Казеїновий пептон		Кукурудзяний крохмаль	
	Вміст, г	Вміст, г	Особливість приготування	Вміст, г	Особливість приготування
0,209	0,418	3,657	Колба на 300 мл	0,313	Колба на 100 мл
2,09	4,18	36,57	Колба на 3 л	3,13	Колба на 1 л

*Яловичий екстракт та казеїновий пептон стерилізується в одній ємності

5.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *C. laurentii* BNM 0525, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: кукурудзяний крохмаль, казеїновий пептон, яловичий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Оскільки кукурудзяний крохмаль, казеїновий пептон та яловичий екстракт (композиція А) є термолабільними речовинами, вони потребують м'якого режиму стерилізації. З огляду на невеликий об'єм (0,209 л) середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках, його стерилізацію буде проведено в автоклаві.

Для здійснення культивування у колбах на качалках варто приготувати 0,209 л середовища. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування середовища наведено в табл. 5.8.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці (0,209 л = 209 мл)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,209 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяний крохмаль	1,5	0,313	А	0,06
Вода		0,06 л		
Казеїновий пептон	17,5	3,657		0,149
Яловичий екстракт	2	0,418		
Вода		0,149 л		
Всього		0,209 л		0,209

5.3.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 4 л

Середовище ділиться на такі композиції:

Композиція А: кукурудзяний крохмаль, казеїновий пептон, яловичий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Склад компонентів та параметри стерилізації є ідентичними попередньому етапу. Композицію А готують в окремому реакторі-змішувачі та стерилізують безпосередньо у ферментері.

Для даної стадії необхідно приготувати 2,09 л середовища. Розрахунок необхідних компонентів середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 4 л, наведено в табл. 5.9.

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 4 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,09 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяний крохмаль	1,5	3,13	А	0,55
Вода		0,55 л		
Казеїновий пептон	17,5	36,57		1,54
Яловичий екстракт	2	4,18		
Вода		1,54 л		
Всього		2,09 л		

5.4. Особливості підготовки розчину нітрату срібла

Для циклу виробництва наночастинок варто підготувати 1,98 літрів кінцевого продукту (супернатанту) та стільки ж мМ AgNO₃.

$$1 \text{ мМ AgNO}_3 = 1 \text{ мл } 1 \text{ М AgNO}_3$$

Стерилізація 1 М AgNO₃ проводитиметься методом холодної фільтрації з використанням шприцевого фільтра на 0,22 мкм.

Отже технологічна схема буде включати такі стадії:

1. Підготовка стерильного аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
2. Підготовка та стерилізація 1,98 мл 1 М AgNO₃.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання допоміжних робіт та виробничого культивування для біосинтезу наночастинок срібла

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник VLB100 («NavyFlex»). Нержавіюча сталь, обладнаний сіткою для запобігання потрапляння дрібних предметів чи комах в установку; d = 100 мм [42].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря («DustFilter»). Касетний повітряний фільтр; вологостійка фанера; неткані полотна із синтетичних волокон, товщина 20 мм; E = 80-90%; габаритні розміри = 170x160x90 мм [43].
К-3	Компресор	1	Компактний компресор PAC11-180 («WORCRAFT»). Продуктивність = 180 л/хв; потужність 1100 Вт; робочий тиск = 8 бар; вага = 6,7 кг [44].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Рефрижераторні осушувачі стисненого повітря («Dalgakiran DryAir»). Продуктивність = 0,58 м ³ /хв; вага = 32 кг; габаритні розміри = 423x393x567 [45].
РС-5	Ресивер	1	Ресивер («КОМПРЕСОМАСh-SERVIS»). Укомплектований манометром, кранами і клапанами. Об'єм, л: 100; максимальний тиск: 12 атмосфер [46].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний повітрянагрівач серії VBC («Systemair»). Труби з алюмінієвим покриттям, корпус з алюмінієвим покриттям; має знімну панель; максимальна температура = 150°C; максимальний робочий тиск = 16 бар [47].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Кишеньковий повітряний фільтр класу F9 («ССК ТМ»). Оцинкована або пластмасова рама з фільтруючим матеріалом; кількість кишень = 4 шт; габаритні розміри = 592x600x287 мм; E>95% [48].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дячишина А. В.				Літ..	Арк..	Віркушів
Перевір.								
Реценз.		Скряцька О.І.						
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						БТ-4-2		

Закінчення табл. 6.1

Ф-8	Фільтр	1	Фільтр («Optiseal») Діаметр пор - 0,22 мкм, фільтраційна площа – 0,18 м ² [49].
ФР-9	Ферментер	1	Біореактор об'ємом 4 л («by SGS Group logo Xi'an Tortion Instrument Co., Ltd.»). Нержавіюча сталь SS304; оснащений датчиками температури, рН, сорочкою та мішалкою = 0~600 об/хв; напів-автоматична система; габаритні розміри = 156x81x73 см [50].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема процесу біосинтезу наночастинок срібла за допомогою *S. laurentii* BNM 0525 складається з допоміжних робіт («ДР» - стадії підготовки стерильного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ, підготовка розчину 1мМ AgNO₃) та технологічного процесу («ТП» - підготовка посівного матеріалу у колбах на качалці, виробниче культивування *S. laurentii* BNM 0525 у ферментері об'ємом 4 л).

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Через вертикальну трубу (ПЗ-1) повітрязабірником у найвищій точці (2 м від рівня даху) забирається атмосферне повітря.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубих домішок

Аераційне повітря, через фільтр грубого очищення (Ф-2), проходить очистку з метою затримання повітряних домішок $\geq 10\text{-}5$ мкм ($E = 80\%$).

ДР 1.3. Стиснення повітря

Для подолання гідравлічного тиску стовпа рідини у ферментері та інших опорів, стиснення повітря проводяться у компресорі (К-3) до $P = 0,35$ МПа. Температура повітря при даному процесі складає 120-250 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

За допомогою охолоджуючого теплообмінника (Т-4), нагріте стиснене повітря охолоджують до точки роси (25-30 °С). Через краплевловлювачі ресивера (РС-5), проходить видалення зайвої вологи, там також усувається пульсація руху повітря. Вологість після процесу складає 60-70%.

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		. Дячишина А. В.				Літ..	Арк..	Важушів
Перевір.							44	
Реценз.		Скороцька О.І.				БТ-4-2		
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.5. Нагрівання повітря

У теплообміннику-нагрівачі (Т-6), повітря підігрівають (до $t = 40-45$ °С), для стабілізації тиску та температури перед подачею до ферментера. Вологість після процесу складатиме 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Для очистки на 95%, повітря пропускається через головний фільтр очистки (Ф-7).

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря пропускається через індивідуальний фільтр (Ф-8), для очищення на 99,99%. Фільтр встановлений безпосередньо на ферментері і є заключною стадією очистки. Підготоване очищене повітря направляється до стадії *ТП 4.1*.

ДР 2. Приготування та стерилізація розчину нітрату срібла

ДР 2.1. Приготування та стерилізація розчину нітрату срібла для біосинтезу AgNPs

На технічних вагах зважують 0,34 г нітрату срібла, переміщують у хімічну склянку, доливають об'єм до 1,95 мл питної води. У зоні стерильності за допомогою шприца пропускають розчин через шприцевий фільтр 0,22 мкм у стерильний посуд, забезпечуючи видалення часток і можливих мікроорганізмів. Підготований розчин надалі відправляється до стадії виробничого біосинтезу.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування інокуляту в колбах на качалках

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

Для даного етапу, за розрахунками, потрібно приготувати 0,209 л (209 мл) поживного середовища. На технічних вагах зважують 0,313 г кукурудзяного крохмалю, вносять в колбу об'ємом 100 мл, додають 0,06 л води

та перемішують. Далі колбу поміщають у водяну баню, встановлюють температуру 70°C та перемішують скляною паличкою впродовж 30 хв. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв, P = 0,05 МПа. Готове середовище надходить до стадії *ТП 4.4.*

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,418 г яловичого екстракту та 3,657 г казеїнового пептону. Вносять відібрані наважки у колбу об'ємом 300 мл, додають 0,149 л води та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120°C, 30 хв, P = 0,75 МПа. Готове середовище надходить до стадії *ТП 4.4.*

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 4 л

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

Для даного етапу, за розрахунками, потрібно приготувати 2,09 л поживного середовища. На технічних вагах зважують 3,13 г кукурудзяного крохмалю, вносять в колбу об'ємом 1 л, додають 0,55 л води та перемішують. Далі колбу поміщають у водяну баню, встановлюють температуру 70°C та перемішують скляною паличкою впродовж 30 хв. Далі колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв, P = 0,05 МПа. Готове середовище надходить до стадії *ТП 5.1.*

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 4,18 г яловичого екстракту та 36,57 г казеїнового пептону. Вносять відібрані наважки у ферментер (*ТП 5.1*) об'ємом 4 л, додають 1,54 л води та вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізація проходить в біореакторі при 120°C, 30 хв, P = 0,75 МПа.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *C. laurentii* BNM 0525 зберігають у пробірках на щільному скошеному поживному середовищі з агаром (ПДА), без доступу світла при низькій температурі (2-4 °С). Культуру пересівають раз в 4 місяці. При роботі з колекційною культурою дотримуються умов асептики.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру (ТП 4.1.) за допомогою методу виснажуючого штриха засівають на чашку Петрі з щільним агаризованим середовищем (ПДА) для отримання ізольованих колоній. Культивування проводять в термостаті при 30 °С впродовж 72 год.

ТП 4.3. Вирощування інокуляту в пробірках на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії *C. laurentii* BNM 0525 (ТП 4.2) пересівають у пробірки з скошеним агаризованим середовищем (ПДА), для засіву однієї колби використовують одну ізольовану колонію. Обирають колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см один від одної. Культивують в термостаті, при 28 °С впродовж приблизно 72 год.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В пробірку з робочою культурою *C. laurentii* BNM 0525 (ТП 4.3.) додають 5 мл дистильованої води та суспендують клітини, відбирають за допомогою піпетки одержану суспензію та вносять її у попередньо простерилізовану качалочну колбу (750 мл), куди вже внесли простерилізовану композицію А (ДР 3.1.1) та Б (ДР 3.1.2) з поживним середовищем. Здійснюють культивування при 28 °С з частотою обертів 100 об/хв, 24 год. Всі дії проводять в асептичних умовах. Одна пробірка з культурою використовується для засіву однієї колби для культивування.

Після культивування культуральну рідину з колб за допомогою факела переносять у ферментер об'ємом 4 л (ФР-9), переходячи до стадії виробничого культивування ТП 5.1.

На при кінці культивування проводять мікробіологічний аналіз, перевірку концентрації біомаси, джерела вуглецю та азоту в культуральній рідині.

ТП 5. Виробниче культивування

ТП 5.1. Виробниче культивування в ферментері об'ємом 4 л

До ферментеру (ФР-9), де знаходиться попередньо простерилізована композиції Б (ДР 3.2.2) додають простерилізовану композицію А (ДР 3.2.1). Далі, вмикають перемішуючий пристрій та барботер і додають посівний матеріал від *ТП 4.4*. Здійснюють культивування при 28 °С з частотою обертів 100 об/хв і постійною аерацією впродовж 24 год.

Після культивування культуральну рідину перекачують у центрифугу, для отримання супертнатанту і подальшого виробничого біосинтезу.

Кожні 8 годин проводять мікробіологічний аналіз, перевірку концентрації біомаси, джерела вуглецю та азоту в культуральній рідині.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Мікробний синтез наночастинок срібла вимагає підбору оптимальної схеми їх виділення та очищення з культуральної рідини. Запропоновано використання наночастинок срібла для терапії інфекційних захворювань дихальних шляхів. Оскільки використання НЧ срібла пропонується у формі лікарського засобу для лікування хвороб дихальних шляхів, то потрібно розробити схему виділення та очищення цільових НЧ для одержання їх субстанції, яка потім підлягатиме включенню до складу лікарського препарату.

Автори статті [58] описали одержання наночастинок срібла після їх біосинтезу. Культуральну рідину з наночастинами срібла центрифугували п'ять разів (при 10 000 об/хв), повторно диспергуючи у воді, для видалення решти неперетворених іонів срібла.

Після останнього центрифугування наночастинок переносили в пробірку для діалізу з порогом молекулярної маси 12 000. Наночастинок ресуспендували в 1 мл буфера HEPES (20 мМ, рН 7,4), доповненого сахарозою до досягнення щільності 2,5 г/мл.

Розчин поміщали на дно центрифужної пробірки (13 мл). Нашаровували 12 мл лінійного градієнта щільності сахарози (0,25–1 М) на суспензію наночастинок і піддавали ультрацентрифугуванню у режимі 200 000 об/хв при 4 °С протягом 16 годин. Збирали фракції по 1 мл, а очищений зразок НЧ додатково досліджували [58].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		. Дячишина А. В.				Літ..	Арк..	Врушив
Перевір.								
Реценз.		Скороцька О.І.						
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						БТ-4-2		

Разом з тим, українські вчені представили роботу, що стосувалась синтезу нанопорошків срібла. Досліджено поетапне відновлення іонів Ag^+ гідразином у присутності срібних центрів нуклеації без використання стабілізаторів для одержання наночастинок срібла [59].

Отриманий осад відділяли центрифугуванням при 3 000 об/хв упродовж 15 хв з використанням центрифуги К-24 D (“MLW Zentrifugenbau Engelsdorf”) (Німеччина), промивали надлишком дистильованої води і висушували на повітрі при 90 °C до постійної маси. Отриманий продукт являв собою порошок чорного кольору. Вихід цільового продукту становив 85 % [59].

Лисенков зі співавторами [60] описали синтез, структуру та антимікробні властивості наночастинок срібла, сформованих у присутності гіперрозгалуженої іонної рідини. НЧ срібла отримували відновленням срібла в складі AgNO_3 тринатрійцитратом у присутності запропонованого іонвмісного олігомера гіперрозгалуженої будови ГР- $([\text{SO}_3] - [\text{NMim}^+])_{32}$ як стабілізатора їхньої поверхні. В кінці процесу отримання наночастинок срібла колір розчину змінювався від жовтого до коричневого. Після цього розчин фільтрували, воду випарювали при 70–75 °C, отриманий у вигляді коричневого осаду продукт вакуумували при залишковому тиску 1–3 мм.рт.ст. і температурі 75–80 °C, промивали етанолом та сушили в вакуумі (1–3 мм.рт.ст.) при 75–80 °C. Вихід продукту становив 0,868 г. Отриманий продукт був порошком коричневого кольору. Отриманий порошок розчинний у воді та нерозчинний в органічних розчинниках [60].

Отже, спираючись на наведені вище літературні дані, схема післяферментаційного одержання наночастинок срібла буде наступною: відділення наночастинок срібла від культуральної рідини, диспергування у воді та наступне відділення НЧ, промивання етанолом та висушування.

Нижче охарактеризуємо кожен з етапів, підбираючи найбільш оптимальний метод для здійснення кожної стадії.

Відділення наночастинок срібла від культуральної рідини

У наведених вище статтях науковці використовували методи фільтрування та центрифугування.

Під фільтруванням розуміють розділення твердої та рідкої фаз під час перепускання суспензії крізь пористу перегородку (фільтр). Сьогодні до методів фільтрування можна віднести і мембранні процеси відокремлення від дисперсійної фази не тільки твердих частинок, але й розчинених речовин з утворенням концентратів цих речовин і пермеатів. Найпоширенішим видом фільтрації є фільтрування з утворенням осаду [61].

Центрифугування – процес розділення рідких неоднорідних систем в полі відцентрових сил з використанням суцільних або проникних для рідини перегородок. Розрізняють відцентрове осадження і відцентрове фільтрування. У першому випадку центрифугування виконується в роторах з суцільними стінками, у другому – з перфорованими. Суспензії можна розділяти як в суцільних роторах, так і в перфорованих, а емульсії – тільки в роторах, що мають суцільну стінку. Для центрифугування призначені машини, звані центрифугами і рідинними відцентровими сепараторами [62].

Режим процесу центрифугування можна регулювати, змінюючи швидкість подачі суспензії, частоти обертання ротора, діаметра зливного борта. До переваг центрифугування можна віднести високу продуктивність при малих габаритах і безперервність технологічного процесу, надійність в роботі, зручність в експлуатації, можливість отримання продукту постійної якості [63].

Отже, після біосинтезу наночастинок срібла будемо проводити центрифугування утвореної культуральної рідини в режимі 10 000 об/хв протягом 10 хв.

Розчинення та відділення наночастинок

Відділені центрифугуванням наночастинок слід повторно диспергувати у воді з метою видалення решти неперетворених іонів срібла.

У статті [64] описано, що синтезовані наночастинки срібла диспергували в стерильній надчистій воді з концентрацією 1 г/л.

Тому приймаємо диспергування наночастинок срібла в очищеній воді у концентрації 1 г/л. Після цього будемо здійснювати центрифугування приготованої суміші в режимі 10 000 об/хв протягом 10 хв. Загалом перерозчинення та центрифугування суміші наночастинок будемо проводити 5 разів для видалення решти неперетворених іонів срібла [58].

Промивання наночастинок срібла

Протягом останніх тридцяти років повідомлялося про використання етанолу для отримання нанопорошків з низькою агломерацією для різних оксидних систем. В сучасній науковій літературі є відомості, що промивання етанолом покращує текстурні властивості наночастинок та дозволяє отримати очищений продукт. Механізм, що лежить в основі цього процесу, включає зниження швидкості депротонування в середовищі етанолу, що в кінцевому підсумку зменшує конденсацію окремих оксидів металів [65].

Наночастинки, отримані технологією з промиванням етанолом, не тільки характеризувались відсутністю домішок та мали бажаний склад, але й демонстрували чітку трапецієподібну морфологію зі зниженою агломерацією та більшою площею поверхні [65].

Таким чином, після центрифугування наночастинки срібла будемо промивати 96% етиловим спиртом для одержання чистого продукту та забезпечення чіткої морфології і більшої площі поверхні. Слід зазначити, що промивання етанолом також сприятиме зневодненню наночастинок срібла, оскільки на попередній стадії їх відцентрифугували з водного середовища.

Висушування наночастинок срібла

У наведених вище роботах висушування НЧ срібла проводили на повітрі при температурі 90 °С до постійної маси [59] та при вакуумі (1–3 мм.рт.ст.) за температури 75–80 °С [60].

Сушіння – це процес видалення вологи з вологого матеріалу. Сушіння є кінцевою стадією виробництва багатьох продуктів мікробного синтезу, іноді її застосовують як проміжний процес при отриманні високоочищених препаратів. Для сушіння біологічних об'єктів застосовують різноманітні способи і установки. Вони розрізняються за агрегатним станом вологи у висушуваному матеріалі (сушіння з рідкого стану або з твердого), а також за способом підведення теплоти (контактна, конвективна і радіаційна). Вибір способу сушіння залежить від виду початкового матеріалу [61].

Сьогодні для сушіння вказаних продуктів найширше використовують сушарки, принцип дії яких ґрунтується на **конвективному** методі підведення тепла (пневматичні, аерофонтанні, з киплячим шаром, розпилювальні). Передача тепла здійснюється за допомогою гарячого повітря, інертних, топкових газів. Рушійною силою процесу є різниця температур сушильного агента і поверхні матеріалу. Найкращими серед конвективних апаратів треба вважати такі, які дозволяють проводити сушіння протягом декількох секунд.

При **контактній сушці** матеріал нагрівається в результаті безпосереднього зіткнення з гарячими поверхнями (плитами, вальцями і т. п.). На цьому принципі засновані шафові і вальцові сушарки. Проте вони малопридатні для сушки термолабільних препаратів і мають ряд недоліків [61].

Вакуумне сушіння вимагає меншої витрати теплоти внаслідок (майже) відсутності втрат з повітрям, що викидається з сушарки. Перевагою вакуум-сушарок є стерильність середовища. Герметичність сушильної камери дає гарантію проти забруднення продукту пилом з навколишнього середовища й окислювання його киснем повітря. Вакуумне сушіння дозволяє також виключити виділення з матеріалу шкідливих парів і газів у навколишнє середовище, що особливо важливо при сушінні отруйних речовин [66]

Вакуум-сушильні шафи призначені для сушіння термолабільних продуктів, але процес відбувається за кімнатної або підвищеної температури,

яку витримує матеріал, наприклад, деякі види антибіотиків. Сушіння відбувається періодично, тобто у шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, починають обігрівання шафи паром через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують, коли матеріал матиме певну залишкову вологість, після чого готовий сухий матеріал вивантажують [61].

Зважаючи на очевидні переваги вакуумного способу, будемо проводити висушування наночастинок срібла при вакуумі в режимі 1–3 мм.рт.ст. за температури 75–80 °С.

Фасування, пакування

Наночастинки срібла у промислових масштабах пакуються відповідно до їх фізичної форми (порошок або колоїдний розчин) та обсягу замовлення.

Висушені наночастинки срібла пропонується фасувати на фасувальному автоматі в подвійні антистатичні полімерні пакети дозами по 25, 50 та 100 г [67].

На запаяні пакети наносять етикетку, що має містити обов'язкові елементи згідно з міжнародними стандартами безпеки та класифікації хімічних речовин, зокрема вимогами GHS (Глобально узгоджена система класифікації та маркування хімікатів). Етикетка має містити наступну інформацію: назву речовини, CAS-номер (7440-22-4), маса нетто (25, 50 або 100 г), піктограми небезпеки, розмір частинок, інформацію про виробника, дата виготовлення та номер партії, умови зберігання [68, 69].

Промаркований продукт пакують у групову упаковку, що являє собою картонні коробки.

Схема одержання субстанції наночастинок срібла представлена на рисунку 3.1.

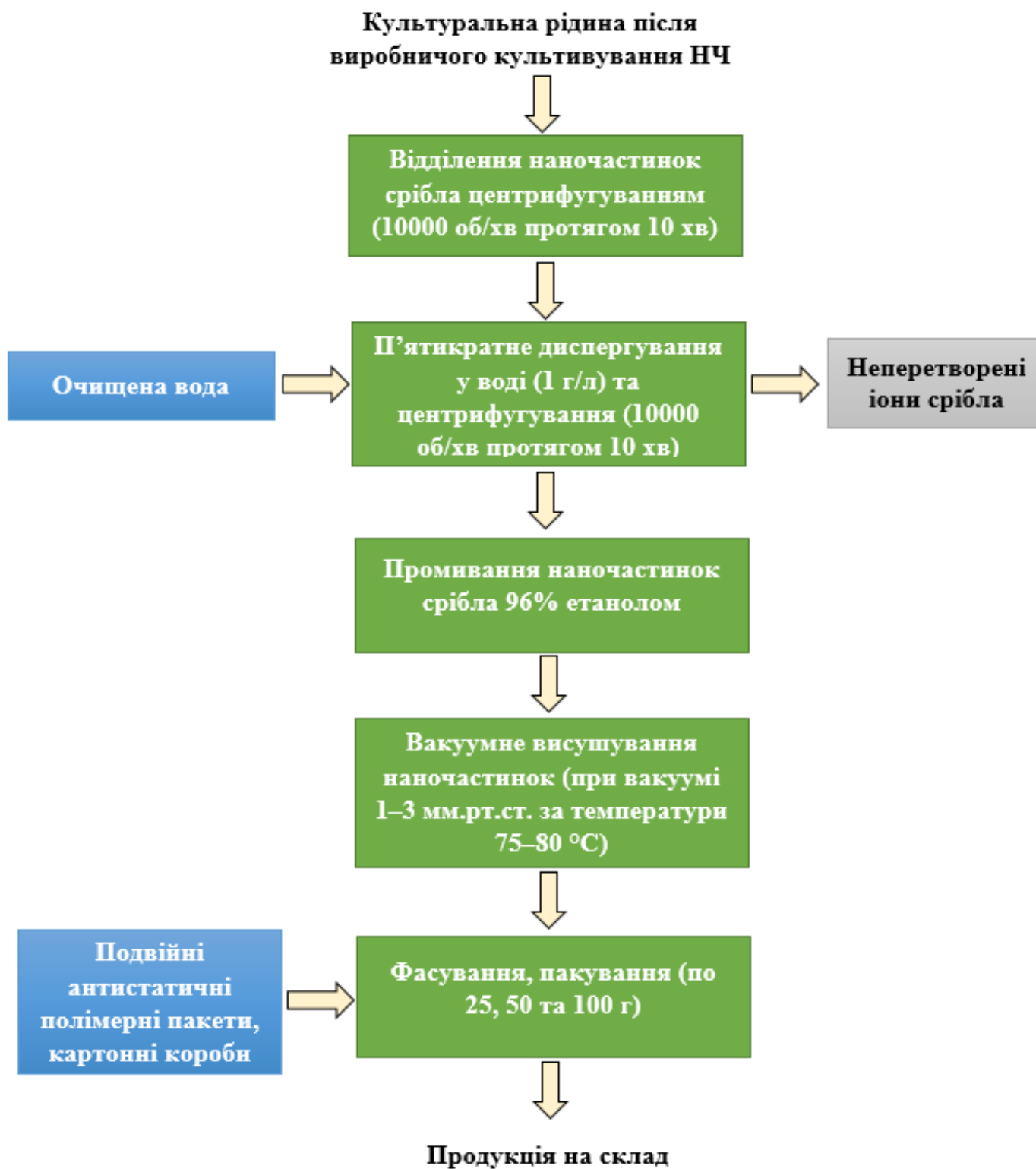


Рис. 8.1. Схема одержання субстанції наночастинок срібла.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

Оскільки культивування *S. laurentii* BNM 0525 для біосинтезу наночастинок срібла здійснюється в умовах асептики, необхідно проводити мікробіологічний контроль на всіх етапах для впевненості у відсутності контамінації.

9.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти поживних середовищ

Перевірку стерильності поживного середовища після стерилізації здійснюють наступним чином: відбирають пробу поживного середовища стерильною піпеткою та переносять на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та глюкозо-картопляним агаром (ГКА) чи сусло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів, рівномірно розподіляючи по всій поверхні шпателем Дригальського. Далі чашки Петрі загортають в папір та інкубують (МПА - 24-48 год, 32-34 °С; СА - 72-120 год, 24-26 °С). По завершенню інкубування на чашках повинні бути відсутні будь-які ознаки росту мікроорганізмів, в протилежному випадку середовище вважають контамінованим [51].

9.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Кожні 4 год з колб і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу. Мікробіологічний контроль чистоти культури здійснюють двома методами [51].

Прямий висів на агаризовані поживні середовища. Культуральну рідину розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та глюкозо-картопляним агаром (ГКА) чи сусло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів [51].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		. Дячишина А. В.			Літ..	Арк..	Важушів
Перевір.							
Реценз.		Скороцька О.І.			БТ-4-2		
Н. Контр. Н.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Мікроскопіювання. Проводять мікроскопіювання у світловому мікроскопі методом «роздавленої краплі». На чисте знежирене предметне скло в асептичних умовах з використанням стерильної піпетки наносять невелику краплю культуральної рідини й накривають предметним скельцем. Надлишок рідини видаляють фільтрувальним папером [51].

В полі зору мікроскопу маємо спостерігати типові для *C. laurentii* BNM 0525 клітини (рис. 5.1). Клітини мають яйцеподібну форму, розміри 2-5x3-7 мкм. Дріжджові клітини групуються в ланцюжки по 3-4. Якщо в полі зору мікроскопу видно клітини, які характеризуються іншими морфологічними ознаками, то це свідчить про наявність сторонньої мікрофлори.

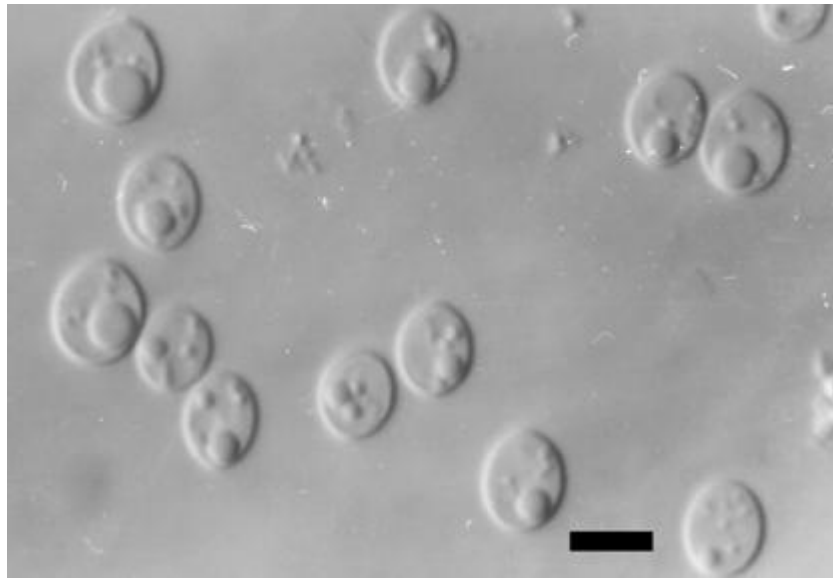


Рис. 5.1. Морфологія *Cryptococcus laurentii* (BCRC 22249), вирощеного в глюкозно-дріжджовому екстрактно-пептонному бульйоні протягом 3 днів при 25°C [52].

9.2. Контроль показників росту

9.2.1. Визначення концентрації біомаси

Біомасу визначають ваговим методом. З цією метою відбирають 40 мл культуральної рідини, промивають дистиллятом та центрифугують при 5000g протягом 30 хвилин. Концентрацію біомаси визначають після висушування

при 105°C до досягнення постійної маси, після чого її зважують і розраховують концентрацію відповідно до кількості відібраної проби [53].

9.2.2. Визначення концентрації джерела Карбону у середовищі

У якості джерела вуглецю в поживному середовищі виступає крохмаль, котрий визначають методом Мюллера-Рьобера. Для цього відбирають 5 мл зразка культуральної рідини й центрифугують при 20000g, після чого супернатант зливають, а до осаду додають 1 мл 80%-го розчину етанолу та інкубують впродовж 30 хв при 80°C. Після цього зразок знову центрифугують за тих же параметрів, зливають супернатант і промивають осад етанолом, додають 400 мкл 0.2 М розчину КОН й витримують при 95°C для розчинення крохмалю. Через 1 год до зразку додають 70 мкл 1 М розчину оцтової кислоти, центрифугують 10 хв при 20000g, після чого змішують 20 мкл супернатанту змішують з тією ж кількістю 50 мМ ацетату натрію (рН 5,6), що містить амілоглюкозидазу з активністю 10 од/мл, й інкубують 2 год при 37°C. У результаті крохмаль розкладається до глюкози, яку далі визначають глюкозооксидазним методом [54].

Глюкозооксидазний метод заснований на розкладанні глюкози до глюконової кислоти з утворенням пероксиду водню, який в свою чергу у присутності пероксидази синтезує хінонімін. Дана сполука має червоно-фіолетове забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації глюкози [55].

Для визначення здійснюють центрифугування культуральної рідини впродовж 10-15 хв при 3000 об/хв, після чого до супернатанту додають глюкозооксидазу, пероксидазу, фізіологічний розчин і KH_2PO_4 . Отриману суміш перемішують та витримують за 18-25°C протягом 20 хв. Далі вимірюють оптичну густину калібрувальної та дослідної проб відносно холостої при 500-550 нм. Кількість глюкози розраховують за формулою [55]:

$$C = \frac{10 \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}}$$

C – Концентрація глюкози в дослідній пробі, г/л;

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, г/л;

$E_{\text{досл}}$ = оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{кал}}$ = оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності.

9.2.3. Визначення концентрації джерела Нітрогену в середовищі

Зважаючи на те, що у якості джерела азоту використовується пептон, що в основному містить у своєму складі білки, найбільш підходящим було б використати метод біуретової реакції на визначення загального білка. Дане визначення базується на реакції білка у лужному середовищі з CuSO_4 , внаслідок чого можна спостерігати появу фіолетового забарвлення. Його інтенсивність визначають фотокolorиметром, при цьому чим більшою є інтенсивність забарвлення, тим більше білків у розчині [56].

Для початку здійснюють центрифугування культуральної рідини при 3000 об/хв впродовж 20 хв, після чого в одну пробірку вносять 0,1 мл дистильованої води в якості контролю, а в іншу ту ж кількість стандартного розчину білка (50 г/л), в решту – по 0,1 мл супернатанту. Після цього до кожної пробірки вносять по 5 мл біуретового реактиву, перемішують та витримують при кімнатній температурі 30 хв. Оптичну густину калібрувальної або дослідної проби проти холостої вимірюють при 540-560 нм. Концентрація загального білка розраховується за формулою [57]:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 50$$

C – концентрація загального білка в дослідній пробі, г/л;

$E_{\text{досл}}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

50 – концентрація загального білка в калібрувальному розчині, г/л.

9.3. Характеристика цільового продукту (наночастинок срібла)

Спектрофотометрія, наносайзер та трансмісійна електронна мікроскопія – це методи, які застосовують для характеристики наночастинок

срібла, зокрема для визначення їхніх спектральних властивостей, розмірів та форми.

9.3.1. Спектрофотометричний аналіз наночастинок срібла

Визначення концентрації наночастинок срібла у супернатанті культури дріжджів проводили методом УФ-спектрофотометрії при 420 нм. Калібрувальна крива була побудована з використанням Ag NPs в діапазоні від 5 до 20 мг/л. Для валідації спектрофотометричного аналізу використовували метод додавання внутрішнього стандарту (spiking). Відому концентрацію Ag NPs додавали до суспензій Ag NPs в кількості 5, 10 і 20 мг/л⁻¹ та до зразків, отриманих з дріжджових культур. *S. laurentii*. Результати спайкінгу використовувалися для створення графіку, а потім проводився статистичний аналіз для оцінки точності методу [39].

9.3.2. Вимірювання на наносайзері

Середній діаметр наночастинок визначали за допомогою Zetasizer Nanoseries ZEN3600, Malvern Instruments, методом фотонної кореляційної спектроскопії (ФКС), який використовується для визначення розміру наночастинок у розчині шляхом аналізу коливань інтенсивності розсіяного світла. Дзета-потенціал вимірювали на тому ж обладнанні [39].

9.3.3. Трансмісійна електронна мікроскопія

Зображення наночастинок з високою роздільною здатністю, дозволило вивчити їх форму та структуру за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ; Carl Zeiss СЕМ902) та рентгенівської дифракції (Shimadzu XRD6000) [39].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tang S., Zheng J. Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, 7(13). doi: 10.1002/adhm.201701503.
2. Matei A., Matei S., Matei G.M., Cogălniceanu G., Cornea C.P. Biosynthesis of silver nanoparticles mediated by culture filtrate of lactic acid bacteria, characterization and antifungal activity. *The EuroBiotech Journal*. 2020, 4(2): 97-103. doi: 10.2478/ebtj-2020-0011.
3. Akl B.A. , Maha M.N., El-Saadony M. T. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Serratia marcescens* ssp *sakuensis* and its antibacterial application against some pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 2020, 11 (1): 1 – 8. doi: 10.21608/jacb.2020.76656.
4. Харченко Є.І., Лазюка Ю.В., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М. Отримання біогенних наночасток срібла з використанням дріжджів і перспективи їх застосування у протимікробній терапії. *Наукові праці НУХТ*. 2021, 27(3): 32-42. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-3-6.
5. Zivic F., Grujovic N., Mitrovic S., Ahad I.U., Brabazon D. Characteristics and application of silver nanoparticles. In: Commercialization of nanotechnologies – a case study approach (ed. Brabazon D., Zivic F., Sort J., Baró M.D., Grujovic N. et al.). *Springer International Publishing*. 2018, P. 227-273. doi: 10.1007/978-3-319-56979-6_10.
6. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 23954, Silver. Retrieved November 25, 2023 - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silver>.
7. Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016, 17(9): 1534. doi: 10.3390/ijms17091534.

8. Liu X., Chen J.L., Yang W.Y., Qian Y.C., Pan J.U., Zhu C.N., Liu L., Ou W.B., Zhao H.X., Zhang D.P. Biosynthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and anticancer properties using two novel yeasts. *Scientific Reports*. 2021, 11: 15795. doi: 10.1038/s41598-021-95262-6.
9. Nie P., Zhao Y., Xu H. Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2023, 15(253): 114636. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114636.
10. Akintelu S.A., Folorunso A.S., Oyebamiji A.K., Erazua E.A. Antibacterial potency of silver nanoparticles synthesized using *Boerhaavia diffusa* leaf extract as reductive and stabilizing agent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2019, 10(12): 374- 380.
11. Arif R., Uddin R. A review on recent developments in the biosynthesis of silver nanoparticles and its biomedical applications. *Medical Devices & Sensors*. 2021, 4: 10158. doi: 10.1002/mds3.10158.
12. Ortega F.G., Fernández-Baldo M.A., Fernández J.G., Serrano M.J., Sanz M.I., Diaz-Mochón J.J., Lorente J.A., Raba J. Study of antitumor activity in breast cell lines using silver nanoparticles produced by yeast. *Int J Nanomedicine*. 2015, 10: 2021-31. doi: 10.2147/IJN.S75835.
13. Boroumand M.A., Namvar F., Moniri M., Tahir P.M., Azizi S., Mohamad R. Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. *Molecules*. 2015, 20(9): 16540-16565. doi: 10.3390/molecules200916540.
14. Niknejad F., Nabili M., Daie G.R., Moazeni M. Green synthesis of silver nanoparticles: Advantages of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Curr Med Mycol*. 2015, 1(3):17-24. doi: 10.18869/acadpub.cmm.1.3.17.
15. Salleh A., Naomi R., Utami N.D., Mohammad A.W., Mahmoudi E., Mustafa N., Fauzi M.B. The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. *Nanomaterials (Basel)*. 2020, 10(8):1566. doi: 10.3390/nano10081566.

16. Гидрозо́ль серебра спрей, коллоидное серебро, Silver Sol, Now Foods, 118 мл - [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://biotus.ua/gidrozol-serebra-sprej-kolloidnoe-serebro-silver-sol-now-foods-118-ml.html>.

17. Серебро American Biotech Labs, SilverSol зубная паста, с ксилитом, ледяная мята, 4 жидких унций (118 мл) - [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://fair.ua/product/serebro-american-biotech-labs-silversol-zubnaya-pasta-s-ksilitom-ledyanaya-myata-4-zhidkikh-untsij-89f308bd.html>.

18. Спрей Аргентум-S – антисептичний засіб, колоїдне срібло - [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.artlife.biz.ua/roslyna_karpat/argentum-santiseptichnij-zasib-koloyidne-sriblo-roslina-karpat.

19. Mohd A.S., Sunitha S., Sofi M.A., Pasha S.K., Choi D. An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles. *Journal of King Saud University – Science*. 2022, 34(2): 101791. doi: 10.1016/j.jksus.2021.101791.

20. Yeap S.P., Rajendran S.D., Wahab S.N. The microbial-killing Ag nanoparticles in food supply chain: How it was applied and what a consumer should know? *Food Frontiers*. 2023, 4: 325–332. doi: 10.1002/fft2.182.

21. Saxena J., Sharma P., Singh A. Biomimetic synthesis of AgNPs from *Penicillium chrysogenum* strain FGCC/BLS1 by optimising physico-cultural conditions and assessment of their antimicrobial potential. *IET nanobiotechnology*. 2017, 11(5): 576–583. doi: 10.1049/iet-nbt.2016.0097.

22. Al-Soub A., Khleifat K., Al-Tarawneh A., Al-Limoun M., Alfarrayeh I., Sarayreh A. A., Qaisi Y. A., Qaralleh H., Alqaraleh M., Albashaireh, A. Silver nanoparticles biosynthesis using an airborne fungal isolate, *Aspergillus flavus*: optimization, characterization and antibacterial activity. *Iranian journal of microbiology*. 2022, 14(4): 518–528. doi: 10.18502/ijm.v14i4.10238.

23. Othman A. M., Elsayed M. A., Al-Balakocy N. G., Hassan M. M., Elshafei A. M. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by

fungal proteins and its application in different biological activities. *Journal of genetic engineering & biotechnology*. 2019, 17: 8. doi: 10.1186/s43141-019-0008-1.

24. Fernández J.G., Fernández-Baldo M.A., Berni E., Camí G., Durán N., Raba J., Sanz M.I. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*. 2016, 51(9): 1306-1313. doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.021.

25. *Papiliotrema laurentii* (Kuff.) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout in GBIF Secretariat (2023). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2023-12-01.

26. *Cryptococcus laurentii* - [Электронный ресурс]. - <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/cryptococcus-laurentii>

27. *Cryptococcus laurentii* - [Электронный ресурс]. - https://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802130004

28. Banerjee P, Haider M, Trehan V, Mishra B, Thakur A, Dogra V, Loomba P. *Cryptococcus laurentii* Fungemia. *Indian J Med Microbiol* 2013;31:75-7.

29. *Papiliotrema laurentii* (Kuff.) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout, in Liu, Wang, Göker, Groenewald, Kachalkin, Lumbsch, Millanes, Wedin, Yurkov, Boekhout & Bai, *Stud. Mycol.* 81: 126 (2015)

30. Ayipo, Y. O., Badeggi, U. M., Jimoh, A. A., & Mordi, M. N. (2024). Silver nanoparticles for treatment of COVID-19 and other viral diseases. In *Silver Nanoparticles for Drug Delivery* (pp. 313-340). Academic Press.

31. Pilaquina, F., Morey, J., Torres, M., Seqqat, R., & Pina, M. D. L. N. (2021). Silver nanoparticles as a potential treatment against SARS-CoV-2: A review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(5), e1707.

32. [Електронний ресурс]. –
<https://compendium.com.ua/med/255191/374097/>
33. [Електронний ресурс]. –
<https://compendium.com.ua/info/369842/692867/>
34. [Електронний ресурс]. –
https://compendium.com.ua/med/556702/koldisept-nanosil_ver-nazal_nyj-sprej/
35. [Електронний ресурс]. –
<https://compendium.com.ua/info/337463/504163/>
36. Щорічний звіт про стан здоров'я населення України та епідемічну ситуацію за 2022 рік. – [Електронний ресурс]. –
<https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%202024/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%2001-2024/29-01-2024/1/%D0%A9%D0%BE%D1%80%D1%96%D1%87%D0%BD%20%D0%B7%D0%B2%D1%96%D1%82%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%20%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%20%D0%B7%D0%B4%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B2%D1%8F%20%D1%82%D0%B0%20%D0%B5%D0%BF%D1%96%D0%B4%D0%B5%D0%BC%D1%96%D1%87%D0%BD%D1%83%20%D1%81%D0%B8%D1%82%D1%83%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8E%20%D0%B7%D0%B0%202022%20%D1%80%D1%96%D0%BA.pdf>
37. Oron Zachar. Formulations for COVID-19 Early Stage Treatment via Silver Nanoparticles Inhalation Delivery at Home and Hospital. ScienceOpen Preprints. 2020. DOI: 10.14293/S2199-1006.1.SOR-.PPHBJEO.v1Fernández J.G., Fernández-Baldo M.A., Berni E. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. Process Biochemistry. 2016. doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.021.

38. Fernández, J. G., Fernández-Baldo, M. A., Berni, E., Camí, G., Durán, N., Raba, J., & Sanz, M. I. (2016). Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*, 51(9), 1306-1313.
39. Fernández J.G., Fernández-Baldo M.A., Berni E. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*. 2016. doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.021.
40. Kegg: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. (n.d.).
<https://www.genome.jp/kegg/>
41. Fernández J.G., Fernández-Baldo M.A., Berni E., Camí G., Durán N., Raba J., Sanz M.I. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*. 2016, 51(9): 1306-1313. doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.021.
42. Повітрязабірник VLB100 «NavyFlex». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://aes.in.ua/uk/povitrozabirnik-stinovij-navyflex-vlb100/>
43. Фільтр грубої очистки повітря «DustFilter» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://growpro.ua/ua/catalog/detail/filtr-gruboy-ochistki-vozdukha-dustfilter-e125/>
44. Компресор портативний електричний «WORCRAFT» [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://worcraft.com.ua/ua/products/kompressor-portativnyj-elektricheskij-pac11-180?srsId=AfmBOoq1vzqDNws7M9b19OCQt4Ubs09M_8DUMh1et0ATjzLPHcPflNf8
45. Рефрижераторні осушувачі стисненого повітря «Dalgakiran DryAir» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/refryzheratorni-osushuvachi-stysnenogo-povitrya-dalgakiran-dryair-seriyi-dk/>

46. Ресивер «КОМПРЕСОР-СЕРВІС» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://k-m-s.all.biz/uk/povitrozbirnyk-resyver-50-l-g7298562?version=amp>
47. Водяний повітрянагрівач серії «Systemair» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promcenter.com.ua/shop/product/vozduhonagrevatel-vodiano-i-systemair-vbc>
48. Кишеньковий повітряний фільтр класу F9 «ССК ТМ» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ccktm.prom.ua/ua/p852157205-filtr-karmannyj-287x592x600.html>
49. Фільтр «Optiseal» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/PL/en/product/mm/cvgl71tp3>
50. Біореактор на замовлення, об'ємом 4 л «by company-logo Henan Zhongyi Kori Equipment Co., Ltd.» [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/SF-Chemical-bioreactor-Lab-Jacket-Glass_1600247544220.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_title.719613a01XjNNd&s=p
51. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. К.: НУХТ, 2019. 252 с.
52. *Cryptococcus laurentii* - [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802130004.
53. Rusinova-Videva S., Nachkova S., Adamov A., Dimitrova-Dyulgerova I. Antarctic yeast *Cryptococcus laurentii* (AL65): biomass and exopolysaccharide production and biosorption of metals. *J Chem Technol Biotechnol.* 2020, 95: 1372–1379. doi: 10.1002/jctb.6321.

54. Ferreira S.J., Kossmann J., Lloyd J.R., Groenwald J.H. The reduction of starch accumulation in transgenic sugarcane cell suspension culture lines. *Biotechnol. J.* 2008, 3: 1398–1406. doi: 10.1002/biot.200800106.
55. Калініченко С.В., Рижкова Т.А., Антушева Т.І., Скляр Н.І., Коротких О.О. Метод визначення катаболічної активності мікроорганізмів за кількістю окисленої глюкози. *Вісник проблем біології і медицини.* 2012, 97: 150-153.
56. Юкало В.Г. Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни «Біохімія» для студентів спеціальності 163 «Біомедична інженерія» усіх форм навчання. – Т.: ТНТУ, 2019. – 78 с.
57. Решетник К. Особливості синтезу білка у міцелії *Pleurotus ostreatus* за дії лазерного опромінення. *Науковий вісник національного університету імені Лесі Українки.* 2020, 2: 25-30. doi: 10.29038/2617-4723-2020-390-2-25-30.
58. Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R., Muniyandi, J., Hariharan, N., & Eom, S. H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 74(1), 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.048>.
59. Bazylyak, Liliya. (2018). Controlled synthesis of silver nanopowders. *Visnyk of the Lviv University. Series Chemistry.* 59. 450. 10.30970/vch.5902.450.
60. Лисенков Е. А., Стрюцький О. В., Клименко Л. П., Демченко В. Л. Синтез, структура та антимікробні властивості наночастинок срібла, сформованих у присутності гіперрозгалуженої іонної рідини. - С. 255-267.
61. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництвЕлектронний ресурс: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

62. Процеси і апарати. Гідромеханічні процеси: Підручник / В.С. Бойко, К.О. Самойчук, В.Г. Тарасенко, Н.П. Загорко, В.Г. Циб. – Мелітополь, 2019. – 212с.

63. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт професійно – орієнтованої дисципліни «Технологічне обладнання м'ясної та молочної галузі» (Частина 3: Обладнання для розділення неоднорідних систем) для студентів напрямку підготовки 6.051701 – харчові технології та інженерія денної форми навчання /Укладачі В. М. Пазюк, О.Д. Пазюк – Вінниця: ВНАУ, 2014. – 32 с.

64. Loza, Kateryna & Diendorf, J. & Sengstock (birth name: Greulich), Christina & Ruiz-González, M. & Gonzalez-Calbet, Jose & Vallet-Regi, M. & Köller, Manfred & Epple, M.. (2014). The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. *J. Mater. Chem. B.* 2. 1634-1643. 10.1039/C3TB21569E.

65. Singh, Kushal & Kumar, Rishu & Chowdhury, Anirban. (2016). Synergistic Effects of Ultrasonication and Ethanol Washing in Controlling the Stoichiometry, Phase-Purity and Morphology of Rare-earth Doped Ceria Nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry.* 36. 10.1016/j.ultsonch.2016.11.030.

66. Ткаченко С. Й., Співак О. Ю. Сушильні процеси та установки. Навчальний посібник. - Вінниця: ВНТУ, 2007. - 76 с.

67. CAS 7440-22-4 99.99% 20nm nano silver powder Nanoparticles [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://www.hwnanoparticles.com/cas-7440-22-4-99-99-20nm-nano-silver-powder-nanoparticles-product/>

68. Hannon, J. C., Kerry, J. P., Cruz-Romero, M., Azlin-Hasim, S., Morris, M., & Cummins, E. (2016). Assessment of the migration potential of nanosilver from nanoparticle-coated low-density polyethylene food packaging into food simulants. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 33(1), 167–178. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1114184>.

69. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Steffensen, I. L., Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Castle, L., Di Consiglio, E., Franz, R., ... Rivière, G. (2021). Safety assessment of the substance silver nanoparticles for use in food contact materials. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 19(8), e06790. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6790>.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Особливості одержання наночастинок срібла за допомогою *Cryptococcus laurentii* BNM 0525

111 studies.

112 2.2. Culture

113 *C. laurentii* and *R. glutinis* were cultured in Muller-Hinton broth (MHB), the
114 composition of which was (g L⁻¹): beef infusion, 2; acid casein peptone, 17.5; corn
115 starch, 1.5; pH 7.4. The medium was inoculated with a suspension of 2.0×10⁶ yeast
116 cells mL⁻¹. Next, the culture flasks were incubated at 28°C and 100 rpm in an orbital
117 shaker. After 24 h of incubation, the cultures were centrifuged at 11,000 × g for 10 min

6

ACCEPTED MANUSCRIPT

118 in a Sorvall SS-3 (DuPont Instruments), and the supernatants were reserved for the
119 synthesis of Ag NPs. Before their use, the supernatants were analyzed immediately,
120 evaluating the cells by microscopic analysis, and a portion was subsequently seeded on
121 potato dextrose agar (PDA) to search for viable cells.

122

Особливості одержання наночастинок срібла за допомогою *Penicillium chrysogenum* FGCC/BLS1

4. Materials and methods

2.1 Chemical, culture media and bacterial strains

The chemicals and culture media used in this paper were purchased from Sisco research laboratories private limited, India and Himedia, India, respectively. The test organisms including MDR *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were kindly provided by Dr. B. Lal Clinical Laboratory Pvt. Ltd. Jaipur (Table 1).

2.2 Isolation of fungi from soil sample

Soil sample from farm area near Manipal University Jaipur was collected aseptically from 6 to 10 cm depth in sterile zip lock plastic bags. About 1 g of each soil sample was serially diluted in sterile conditions. From diluted suspension, 100 μ l was spread on potato dextrose agar (PDA) medium, incubated at 28°C for 3–4 days and was monitored every day for the growth of fungal colony. Four colonies were picked randomly and sub-cultured to obtain pure culture. Furthermore, these fungi were sub-cultured on PDA to obtain the pure strain. The fungal isolates were preserved in slants covered with parafilm at low temperature for future studies.

2.3 Screening for extracellular synthesis of AgNPs

AgNPs were synthesised from fungal isolates as described earlier [18] with slight modifications. The fungal mycelia from selected

2.4.4 **Effect of pH:** To enhance the synthesis of the AgNPs, 2 mM of AgNO₃ was added to the cell free filtrate maintained at 3, 5, 7, 9 and 11 pH and UV-vis spectra was monitored for AgNPs synthesis.

2.4.5 **Effect of different temperatures:** Effect of different temperatures on the rate of AgNPs synthesis was studied. In brief, 2 mM AgNO₃ was added to cell free filtrate of pH 11 and incubated at 20, 30, 50 and 70°C. The sample was analysed at different time intervals in UV-vis absorption spectroscopy to confirm the synthesis of AgNPs.

2.5 Characterisation of AgNPs

Formation of AgNPs was primarily carried out by visual observation of change in colour of the cell free filtrate after treatment with AgNO₃. Appearance of dark brown colour indicates the formation of AgNPs [20].

2.5.1 **UV-vis spectroscopy:** Cell free filtrate from *P. chrysogenum* strain treated with AgNO₃ was monitored on UV-vis spectrophotometer (Systronics) at different time intervals at a resolution of 1 nm.

2.5.2 Fourier-transform infra-red (FTIR) spectroscopy

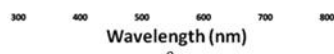


Fig. 3 Optimisation of reaction parameters for AgNP synthesis

(A) Effect of media on AgNPs synthesis: a – SB, b – GYP, c – CZAPEK, d – RM, e – PP and f – PDB. Time-dependent AgNP synthesis in PDB media is shown in inset, (B) Effect of AgNO₃ concentration on AgNPs synthesis: a – control, b – 0.2 mM, c – 0.5 mM, d – 1 mM, e – 1.5 mM, f – 2 mM and g – 2.5 mM. Time-dependent AgNP synthesis at 2 mM media is shown in inset, (C) Effect of biomass on AgNPs synthesis: a – control, b – 0.5 g, c – 1 g, d – 2.5 g, e – 5 g and f – 10 g. Time-dependent AgNPs synthesis at 10 g biomass is shown in inset, (D) Effect of pH on AgNPs synthesis: a – pH3, b – pH5, c – pH7, d – pH9 and e – pH11. Time-dependent AgNPs synthesis at pH11 is shown in inset, (E) Effect of temperature on AgNPs synthesis: a – 20°C, b – 30°C, c – 50°C and d – 70°C. Time-dependent AgNPs synthesis at 70°C is shown in inset

respectively. The peak at 825, 510 and 403 cm⁻¹ maybe due to the presence of alkyl halides.

3.6 Antibacterial activity of AgNPs

The mycosynthesised AgNPs were evaluated for their antimicrobial activity against MDR *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. The results in Fig. 6 exhibit the concentration-dependent (25, 50 and 100 ppm) effect of AgNPs on the test strains, with maximum antibacterial effect at 100 ppm AgNPs on all test strains. Data shown in table 1 suggested maximum zone of inhibition (17.3 mm in case of *E. coli*, 14.2 mm in case of *K. pneumoniae* and 14.7 mm in case of *S. aureus*) was observed at 100 ppm AgNPs concentration. MDR *E. coli* (Fig. 6A) and *S. aureus* (Fig. 6B) did not show zone of inhibition against levofloxacin (5 μ g/disc), whereas growth of *K. pneumoniae* remain unaffected in the presence of ampicillin (10 μ g/disc) (Fig. 6C). Furthermore, to investigate the antibacterial activity of AgNPs in suspension, CFUs of two test strains (MDR *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*)

were counted after 1 h exposure to AgNPs (25, 50 and 100 ppm).

Fig. 6D shows that kill percentage against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus* significantly increases with increase in AgNPs concentration with maximum inhibition at 100 ppm. After 1 h treatment, more than two-fold higher killing percentage was observed at 100 ppm as compared at 25 ppm AgNPs. These results were further validated by studying the effect of the AgNPs (100 ppm) on the kinetics of bacterial growth at 620 nm. The growth kinetics of the *E. coli* (Fig. 6E), *K. pneumoniae* (Fig. 6F) and *S. aureus* (Fig. 6G) were inhibited by AgNPs within 6 h of post inoculation. The data suggested that AgNPs have direct effect on the growth rate of bacterial cells. The results obtained by disc diffusion, per cent kill and growth kinetics clearly indicate that Gram negative bacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*) were more sensitive and susceptible to AgNPs as compared with Gram positive bacteria (*S. aureus*) This is in complete agreement with previous reports [46, 47]. This can be explained in terms of difference in cell wall composition where thick peptidoglycan cell

and temperature were optimised.

3.3.1 Effect of media: Media composition plays an important role in supporting the fungal growth and hence AgNPs synthesis. In view of this, different culture media were used to grow fungal mycelia and synthesis of AgNPs was monitored. Maximum AgNPs production was observed from fungi grown in **PDB media (Fig. 3Af) after 72 h** of incubation (Fig. 3A inset) as evident from UV-vis spectra. This was followed by PP (Fig. 3Ae), RM (Fig. 3Ad), CZAPEK (Fig. 3Ac), GYP (Fig. 3Ab) and SB (Fig. 3Aa). This may be due to the difference in composition among test media that help in producing different amounts of AgNPs [19].

3.3.2 Effect of AgNO₃ concentration: To optimise the salt concentration for enhanced AgNPs production, cell free filtrate was treated with various concentrations of AgNO₃ (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mM). Results shown in Fig. 3B suggested that **maximum AgNPs synthesis occur at 2 mM concentration** (Fig. 3Bf) and further increase in AgNO₃ concentration (2.5 mM) led to decrease in the synthesis of AgNPs. This may be due to complete saturation of enzyme active site catalysing reduction; hence, no more site is available at higher concentration for reduction [35]. Furthermore, time-dependent study shown that AgNPs can be synthesised in 48 h after 2 mM AgNO₃ treatment (Fig. 3B inset).

3.3.3 Effect of biomass: Different amount of fungal biomass (0.5, 1, 2.5, 5 and 10 gm) were used as source of reducing agent for AgNPs synthesis. **UV-vis absorption spectra represent 10 g of biomass** (Fig. 3Cf) showing maximum peak at 430 nm after 24 h of incubation (Fig. 3C inset) and minimum at 0.5 g biomass (Fig. 3Cb). Similar study was conducted by Sunkar and Nachiyar [36], where they mentioned the directly proportional relationship between amount of biomass and release of reducing agent responsible for AgNPs synthesis.

3.3.4 Effect of pH: pH plays a very important role in all reactions including AgNPs production. In the present paper, AgNO₃ was added in the cell free filtrate having different pH (3, 5, 7, 9 and 11) and monitored for AgNPs synthesis at different time interval in UV-vis spectrophotometer. AgNPs synthesis was observed with increase in pH with maximum at **pH 11** (Fig. 3De) followed by pH 9 (Fig. 3Dd). AgNPs were found to be synthesised within 12 h at pH 11 and remain stable (Fig. 3D inset). This can be explained due to the fact that AgNO₃ can be reduced rapidly in the presence of hydroxyl ion generated in alkaline environment results in rapid AgNPs synthesis [35]. Moreover, at high pH more competition

3.3.5 Effect of temperature: Temperature is one of the important factors that affect the enzyme activity as it modulates substrate binding and catalysis. Effect of temperature was studied by incubating AgNO₃ treated cell free filtrate at different temperatures (20, 30, 50 and 70°C). UV-vis spectra clearly show that as the temperature increases the absorbance was also increased and maximum synthesis of AgNPs was observed at **70°C** (Fig. 3Ed) within 8 h of incubation (Fig. 3E inset) and minimum at 20°C (Fig. 3Ea). Our data are in agreement with previous reports [39, 40] where they have mentioned increased kinetic energy at higher temperature is responsible for rapid and enhanced AgNPs synthesis.

3.4 TEM and DLS measurements

Characterisation of shape and size of the mycosynthesised AgNPs under optimised conditions were done. TEM analysis revealed that AgNPs are ellipsoidal and polydispersed in nature (Figs. 4A and B). The SAED pattern (Fig. 4C) indicates the crystalline nature of AgNPs [41]. Furthermore, the hydrodynamic diameter, which is associated with the surface of the particle in solution, was measured by DLS. The particle size distribution was studied and the average particle size measured was **96.8 nm** (Fig. 4D). This reflects the presence of a capping layer formed around AgNPs consisting of proteins secreted by the fungi that play a dual role in the synthesis as well as stabilisation of AgNPs [42, 43]. This has been confirmed further by FTIR studies. The surface charge of AgNPs was found to be -40.2 mV (Fig. 4E). The negative zeta potential values indicate these AgNPs stable without showing signs of aggregation [44].

3.5 FTIR characterisation of synthesised AgNPs

Most of the biogenic AgNPs have stability issues which limit their applications. Therefore, FTIR analysis has been performed in dried and powdered sample to assess the presence of biomolecules surrounding AgNPs that could be responsible for synthesis and stabilisation. Fig. 5 shows the FTIR spectra of *P. chrysogenum* synthesised AgNPs. Intense absorption bands at 3414, 1763, 1654, 1384, 1078, 825, 510 and 403 cm⁻¹ were found. The absorption peak at 3414 cm⁻¹ maybe assigned to N-H stretch that corresponds to primary and secondary amines. The presence of peak at 1763 cm⁻¹ shows the presence of C=O group and assigned to carboxyl group present in proteins [45] indicating the presence of proteins as capping agent responsible for the stability of the AgNPs synthesised. Moreover, peaks seen at 1654 cm⁻¹ revealed N-H bend that correspond to primary amine. The presence of band at 1384 and 1078 cm⁻¹ assigned to alkanes and aliphatic amines,

Визначення концентрації біомаси

Antarctic yeast: biomass production and biosorption of metals

www.soci.org



simplicissimum, was investigated with samples of sewage contaminated with these ions.¹⁷

Yeasts also have been commonly studied with regard to metal ion biosorption. The adsorption properties of *Candida utilis* and *C. tropicalis* of Zn²⁺,¹⁸ *Yarrowia lipolytica* of Ni²⁺¹⁹ were reported. Yeast biosorbents of the genera *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and *Candida* also were studied with established ions such as Cd²⁺, Pb²⁺, chromium (Cr³⁺), zinc (Zn²⁺) and cobalt (Co²⁺).^{20–22} In recent years, Antarctic yeast species have been tested for resistance to high levels of heavy metals.²³ Despite the large number of reports that have thoroughly examined adsorption capacity and kinetics in a single-metal solution, biosorption experiments in a multi-metal solution (with more than four metals) or real effluent are hardly ever found. Adsorptive competition among different metal ions in mixture solutions, the usual actual state of wastewaters, influence the uptake of individual metals, hence enabling selective adsorption. Selective separation and reuse of some pollutants from the environment is a subject that is attracting considerable interest nowadays in view of environmental protection and problems of mineral resource depletion.²⁴ The requirements for an economically feasible biosorption process include high adsorption capacity of biomass with clear affinity to some of the metals in the mixture solution, as well as a suitable means of ion release to ensure efficient recovery of targeted metals in addition to inexpensive and regenerative adsorbents.

Atomic spectroscopic methods for multi-element determination are well suited for such biomass characterization experiments. The low detection limits and high sensitivity of these techniques condition their widespread use in studying sorption/desorption processes. These methods are used for studying the biosorption capability of, for example, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* and *Aspergillus tamarii*.^{25–28}

The purpose of the present study was to evaluate the cell growth and biosynthetic capacity of exopolysaccharide of the Antarctic strain *Cryptococcus laurentii* (AL₆₅) in bioreactor cultivation. A preliminary study was conducted into the biosorption potential of the obtained biomass and extracellular polymer with regard to metal ions. The presence of selectivity for binding of different metal

(1.00 L L⁻¹ min⁻¹), for 96 h. The cells were collected in the stationary phase of growth at 120 h.

Analytical methods

After completion of the fermentation, the biomass was separated from the cultural liquid by centrifugation at 5000×g for 30 min. The EPS was precipitated with two volumes of 95% ethanol at 4 °C for 24 h. The exopolysaccharide was separated from the ethanol solution by centrifugation at 5000×g for 10 min. The dry biomass and the EPS were determined by the weight method after drying to constant mass at 105 °C.²⁹ Preparation for biosorption study included boiling with 0.5 mol L⁻¹ NaOH for 15 min; afterwards the biomass was washed and kept dry.³¹

The assimilation of the carbon source during the fermentation process was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Before the analysis, all samples were filtered through a cellulose acetate filter with 0.2-µm pore size (Sartorius AG, Goettingen, Germany).

Chromatographic analyses were performed on a Shimadzu HPLC apparatus equipped with an LC-20 AD pump, refractometric detector RID-10A and software program LcSolution v1.24 SP1 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A Shodex® type Sugar SP0810 column with Pb²⁺ as a cation exchanger was used (5 µm, 300 × 8.0 mm), and the precursor was Shodex SP-G (8 µm, 6 × 50 mm). The column was placed in the LCO 102 thermostat (ECOM spol. s.r.o., Czech Republic). The mobile phase was deionized water at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ and a column temperature of 85 °C. The solutions were degassed before use. Separation was performed under an isocratic elution mode at a sample volume of 20 µL. The resulting peaks were identified by comparing their retention times with those of sugar standards: sucrose 16.02 min, glucose 17.12 min and fructose 23.55 min. For quantification, the respective peak areas were used.

The adsorption capacity of NaOH-pretreated biomass was determined in batch mode by the mass balance method as the difference between the concentration of metal ions in the multi-element mixture solution after adsorption and their initial concentration (at solubility equilibrium). The removal efficiency was calculated as

Визначення концентрації крохмалю

Genomic DNA was extracted from transgenic sugarcane callus using a modified Tris-buffer method [20]. Plant material was ground to a fine powder in liquid nitrogen in a precooled mortar and pestle. To test for the presence of the recombinant RNAi construct pHairpinAGPase-U3Z, a PCR analysis was conducted using only the forward primer of the primer set that was used for the isolation of the gene as described above. Two primers (5'-ATG ACT TTA ACA CTT CAA TCA TC-3' and 5'-TTA CAC TAC TGC AAC CTC TGT AGC T-3') were designed to amplify the whole *pct-Bmy1* gene sequence to determine whether the recombinant gene pUBI- β -amylase was present.

2.7 Enzyme extractions

For enzyme activity determinations, four duplicates of each transgenic line and control lines were grown in MS3 suspension media. After 14 days, cells were harvested and ground in liquid nitrogen in a mortar with pestle and frozen at -80°C for later analysis. Ground samples (0.05 g) were weighed out and proteins were extracted using 100 μL volumes of protein extraction buffer containing 50 mM Mops-KOH (pH 7.5), 20 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA, 3% w/v PEG-3000, 2% w/v PVPP, and 14.3 mM β -mercaptoethanol. After vigorous vortexing, samples were incubated on ice for 20 min, centrifuged at $20\,000 \times g$ for 10 min at 4°C and the supernatant was used for assaying enzyme activities. Protein contents of samples were determined using the method of Bradford [21].

spectrophotometrically determined at 410 nm, which is directly proportional to β -amylase activity. A unit of β -amylase activity is described as the amount of enzyme that is required to release one μmol of *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl- α -D-maltopentaose in 1 min [23]. All spectrophotometric readings were performed in duplicate.

2.9 Starch determinations

Starch contents were determined using a method modified from Müller-Röber *et al.* [10]. Tissue samples of approximately 0.05 g were weighed and transferred to a microcentrifuge tube containing 1 mL of 80% v/v ethanol. The tube was then incubated at 80°C for 30 min. Samples were centrifuged at $20\,000 \times g$ and aliquots were taken for the determination of soluble sugars. The remaining ethanol was then discarded and the insoluble fractions were washed with 1 mL of 80% v/v ethanol before being dried under vacuum. This insoluble matter was resuspended in 400 μL of 0.2 M KOH and heated at 95°C for 1 h to dissolve the starch. After neutralization with 70 μL of 1 M acetic acid, the sample was clarified by centrifugation at $20\,000 \times g$ for 10 min. To digest the starch to glucose, a mixture of 20 μL of the supernatant and 20 μL of 50 mM sodium acetate (pH 5.6) containing 10 U/mL amyloglucosidase was incubated at 37°C for 2 h. Background glucose amounts were determined by combining 20 μL sample and 20 μL of 50 mM sodium acetate (pH 5.6) and incubating at 37°C for 2 h. Glucose units from starch were determined using the method of Bergmeyer and Bernt [24].

вування були визначені в ході експериментальних досліджень.

До 0,9 мл розробленого субстрату додавали 0,1 мл суспензії бактерій (дослідні проби) з оптичною щільністю 1,0 одиниць за McFarland або 0,1 мл фізіологічного розчину (контрольна проба) та інкубували впродовж 3-24 годин при температурі 37 °С, центрифугували 10-15 хв. при 3000 об./хв., відбирали супернатант, в якому глюкозооксидазним методом за допомогою відповідних комерційних наборів визначали кількість глюкози.

Аналіз проводився у відповідності зі схемою:

Назва речовини	Калібрувальна або дослідна проба, метод дослідження			Холоста проба, метод дослідження		
	макро	напів-мікро	мікро	макро	напів-мікро	мікро
Калібрувальний розчин або супернатант, мл	0,04	0,02	0,01	-	-	-
Фізіологічний розчин, мл	-	-	-	0,04	0,02	0,01
Буферний розчин, мл	2,0	1,0	0,5	2,0	1,0	0,5
Ензими, мл	2,0	1,0	0,5	2,0	1,0	0,5

Суміш ретельно змішати, витримати 20 хв. при кімнатній температурі (18-25 °С), або 12 хв. при температурі 37 °С. Після чого вимірюють оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{кал}}$) та дослідної ($E_{\text{досл}}$) проти холостої проби при довжині хвилі 500-550 нм та довжині оптичного шляху 5-10 мм.

Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою:

Результати досліджень та їх обговорення. У ході проведених досліджень встановлено, що розроблений спосіб, заснований на визначенні концентрації глюкози у субстраті глюкозооксидазним методом, є цілком придатним для оцінки рівня метаболічних процесів мікроорганізмів за показниками кількості утилізованої глюкози та за швидкістю її утилізації.

Можливість застосування вказаного методу для визначення катаболічної активності мікроорганізмів ілюструємо на нижченаведених прикладах (табл. 1, табл. 2).

Таблиця 1
Визначення кількості спожитої глюкози S. aureus ATCC 25923

Проба	Кількість глюкози, ммоль/л		Різниця, ммоль/л
	до інкубації	після інкубації	
Контрольна	33,908	33,908	0
Дослідна	33,908	32,025	1,883

Дані таблиці розраховані за формулою наступним чином:

вміст глюкози в дослідній пробі:

$$C_{\text{досл}} = \frac{10 \times 1,762}{0,5502} = 32,025 \text{ (ммоль/л)}$$

вміст глюкози в контрольній пробі:

$$C_{\text{конт}} = \frac{10 \times 1,866}{0,5502} = 33,908 \text{ (ммоль/л)}$$

Таким чином, кількість глюкози, спожитої культурою *S. aureus ATCC 25923* становить: $C - C =$

ним чином:

вміст глюкози в дослідній пробі:

$$C_{\text{досл}} = \frac{10 \times 1,762}{0,5502} = 32,025 \text{ (ммоль/л)}$$

вміст глюкози в контрольній пробі:

$$C_{\text{конт}} = \frac{10 \times 1,866}{0,5502} = 33,908 \text{ (ммоль/л)}$$

Таким чином, кількість глюкози, спожитої культурою *S. aureus ATCC 25923* становить: $C_{\text{конт}} - C_{\text{досл}} = 33,908 - 32,025 = 1,883$ ммоль/л

Тобто, бактерії, які знаходились у дослідній пробі, утилізували за певний час (тривалість інкубації) 1,883 ммоль/л глюкози.

Для вивчення швидкості метаболічного процесу (перебіг якого сприяє життєдіяльності бактерій) кількість утилізованої глюкози було визначено через різні відрізки часу (табл. 2) і на основі отриманих даних побудовано індивідуальні графіки швидкості метаболізму для кожного взятого у дослід штам (рис.).

Тривалість культивування визначено в діапазоні 3-24 години, оскільки у різних досліджуваних видів мікроорганізмів, за обраних параметрів співвідношення розміру інокуляту та концентрації субстрату, швидкість ферментативних реакцій суттєво відрізнялась.

За отриманими результатами можна зробити висновок про метаболічну активність мікроорганізмів, активацію або пригнічення катаболічних процесів під впливом різноманітних факторів.

Ензими, мл	2,0	1,0	0,5	2,0	1,0	0,5
Суміш ретельно змішати, витримати 20 хв. при кімнатній температурі (18-25 °С), або 12 хв. при температурі 37 °С. Після чого вимірюють оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{кал}}$) та дослідної ($E_{\text{досл}}$) проти холостої проби при довжині хвилі 500-550 нм та довжині оптичного шляху 5-10 мм.						

Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою:

$$C = \frac{10 \times K \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \text{ (ммоль/л)}$$

де, C – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л;

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л;

$E_{\text{досл}}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

K – коефіцієнт розведення (при необхідності).

Кількість розщепленої мікроорганізмами глюкози визначали за різницею між кількістю глюкози в контрольній і дослідних пробах.

Досліди проводили в 3-5 повторюваннях. Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики як викладено у посібниках [2, 11].

Визначення концентрації пептону



Рис. 1. Пристрій для опромінення міцелій монохроматичним світлом за допомогою LED лазерів.

1 – платформа для кріплення пристрою, 2 – електропровідник 1, 3 – електропровідник 2, 4 – захисна кришка для дзеркальної призми, 5 – дзеркальна призма, 6 – транспортна стрічка, 7 – бункер для опроміненних об'єктів, 8 – валки, який рухає транспортну стрічку, 9 – платформа для опроміненних об'єктів, 10 – штатив для кріплення LED лазерів, 11 – LED лазер BGP-3010-5 з випромінюванням зеленого спектру з довжиною хвилі 532 нм, 12 – LED лазер BBR-3010-5 з випромінюванням синього спектру з довжиною хвилі 405 нм, 13 – LED лазер BRP-3010-5, з випромінюванням червоного спектру з довжиною хвилі 635 нм, 14 – панель управління.

Міцелій опромінювали у такий спосіб: чашка Петрі з міцелієм рухається на транспортній стрічці під променем світла зі

Опромінення міцелій проводили в декількох варіантах (табл. 1).

Рівень накопичення біомаси визначали ваговим методом, висушуючи міцелій до постійної маси при температурі $(105 \pm 1)^\circ\text{C}$ [8].

Для визначення кількості білка міцелій відділяли від культурального фільтрату за допомогою паперового фільтра. Підготовлений міцелій гриба в кількості 1 г гомогенізували в ступці з додаванням 10 мл дистильованої води (для альбумінів) або 10% розчину NaCl (для глобулінів) та відцентрували в центрифугі при 2500 об/хв. Для визначення кількості білка застосовували метод біуретової реакції. В першу пробірку вносили 0,1 мл дистильованої води (контроль), у другу – 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/дм^3), в інші пробірки – по 0,1 мл досліджуваного розчину білка. У кожен пробірку додавали по 5 мл біуретового реактиву, перемішували, витримували 30 хв при кімнатній температурі. Виміряли оптичну щільність калібрувальної або дослідної проби проти холостої проби, при довжині хвилі (540–560 нм) в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності. Аналіз проводили згідно зі схемою (табл. 2)

Таблиця 1

Схема опромінення міцелій гриба *Pleurotus ostreatus*

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с			Енергія опромінення, мДж/см ²
	Червоне світло (довжина хвилі 635 нм)	Синє світло (довжина хвилі 405 нм)	Зелене світло (довжина хвилі 532 нм)	
1 (контроль)	0	0	0	0
2	10	0	0	51,1
3	0	10	0	51,1
4	0	0	10	51,1

Таблиця 2

Схема проведення дослідів