

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 «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Бахтій Олени Леонідівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Синергізм антимікробної дії поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 та антифунгальних засобів

керівник роботи Пирог Т.П.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 7 червня 2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, цільовий продукт: поверхнево-активні речовини

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Синергізм антифунгальної дії антимікотиків з біоцидними речовинами природного походження. Розділ 2. Матеріали та методи досліджень. Розділ 3. Антифунгальна активність суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 та протигрибкових препаратів. Розділ 4. Ділянка передферментаційних процесів та виробничий біосинтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241. Розділ 5. Розробка системи автоматизації ділянки виробничої ферментації в процесі виробництва поверхнево-активних речовин. Розділ 6. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва поверхнево-активних речовин – 1 аркуш формату А1. Апарататурна схема виробництва поверхнево-активних речовин

– 1 аркуш формату А1. Схема автоматизації ділянки виробничої ферментації
– 1 аркуш формату А2.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5. Автоматизація ділянки виробництва	Клименко О.М., доцент, к.т.н. кафедра автоматизації та компютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Літературний огляд</i>	<i>01.04.21 - 07.04.21</i>	
2	<i>Матеріали та методи досліджень</i>	<i>08.04.21 - 15.04.21</i>	
3	<i>Дослідження синергізму поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 та протигрибкових препаратів</i>	<i>15.04.21 - 20.04.21</i>	
4	<i>Техніко – економічне обґрунтування.</i>	<i>20.04.21 - 30.04.21</i>	
5	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>01.05.21 - 06.05.21</i>	
6	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>07.05.21 - 15.05.21</i>	
7	<i>Контроль виробництва</i>	<i>16.05.21 - 18.05.21</i>	
8	<i>Автоматизація ділянки виробництва</i>	<i>18.05.21 - 22.05.21</i>	
9	<i>Охорона довкілля</i>	<i>23.05.21 - 27.05.21</i>	
10	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	<i>07.05.21 - 28.05.21</i>	
11	<i>Виконання графічної частини проекту</i>	<i>05.05.21 - 28.05.21</i>	

Здобувач

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена вивченню синергізму антимікробної дії поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 і антифунгальних засобів.

Дослідження проводили на основі порівняння різних середовищ для культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 з метою отримання поверхнево-активних речовин, що проявляють антифунгальні властивості. У роботі було показано здатність штаму рости на середовищі з внесенням промислових відходів, а також синтезувати ПАР, що мають антифунгальні властивості. У роботі було проаналізовані літературні дані, щодо застосування протигрибкових препаратів разом з біоцидними речовинами. Було показано, що використання поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 разом з клотримазолом і флуконазолом вводиться вперше. На основі власних експериментів було виявлено позитивний результат та підтвердження синергічної дії цих препаратів.

В кваліфікаційній роботі розроблено технологічну та апаратурну схем біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) штамом *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, який на середовищі з 4 % (об'ємна частка) відпрацьованої олії після смаження картоплі фрі здатен синтезувати 3,9 г/л ПАР. Розчин ПАР пропонується використовувати у суміші з антифунгальними препаратами для потенційного застосування у ветеринарії.

Розрахована потужність, на основі статистичних даних захворювання дерматомікозів домашніх тварин в Харківській області, становить 1318 л культуральної рідини за 17 трудоднів. Технологічний процес біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовку стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних агентів для регулювання рН середовища, підготовку та стерилізацію поживних середовищ) та основні роботи (одержання посівного матеріалу в колбах на качалці та в інокуляторі об'ємом 5 та 50 л, виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 500 л).

Кваліфікаційна робота складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (120 найменувань), технологічної (формат А1) та апаратурної (формат А1) схем. Загальний обсяг роботи – 119 сторінок, 27 таблиць, 7 рисунків.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИФУНГАЛЬНОЇ ДІЇ АНТИМІКОТИКІВ З БІОЦИДНИМИ РЕЧОВИНАМИ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ.....	13
1.1 Синергічна дія на мікроорганізми комплексу протигрибкових препаратів та ефірних олій	13
1.2 Антимікробна активність суміші поверхнево-активних речовин та антифунгальних препаратів	19
1.3 Синергічна антимікробна активність антимікотиків та інших природних біоцидів	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	24
2.1 Об'єкти досліджень	24
2.2 Культивування <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 на промислових відходах.....	25
2.3 Визначення концентрації поверхнево-активних речовин	27
2.4 Визначення антифунгальної активності ПАР.....	27
2.5 Визначення антифунгальної активності протигрибкових препаратів. ..	29
2.6 Визначення синергічної активності суміші поверхнево-активних речовин та антифунгальних засобів.....	29
РОЗДІЛ 3. АНТИФУНГАЛЬНА АКТИВНІСТЬ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB B-7241 ТА ПРОТИГРИБКОВИХ ПРЕПАРАТІВ.....	31
3.1 Антифунгальна активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	31
3.2 Антифунгальна активність протигрибкових засобів	32

3.3 Синергізм антифунгальної активності поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 з препаратом клотримазолом.....	32
3.4 Синергізм антифунгальної активності поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 з препаратом флуконазолом	35
РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241	37
4.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	37
4.2 Техніко-економічне обґрунтування	42
4.2.1. Потреба у цільовому продукті.....	42
4.2.2. Розрахунок річної потреби.....	47
4.3 Розрахунок потужності виробництва поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ-7241	48
4.3.1 Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері	49
4.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 50 л.....	50
4.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 5 л.....	51
4.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	52
4.4 Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва.....	52
4.4.1 Обґрунтування вибору умов і способу культивування	52
4.4.2 Обґрунтування вибору ферментера.....	53
4.5. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	54

5.6 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	55
4.6.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці	55
4.6.2 Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л.....	56
4.6.3 Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л.....	56
4.6.4 Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу	57
4.7 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН	58
5.8 Специфікація обладнання	61
4.10 Контроль виробництва поверхнево-активних речовин <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	77
4.10.1 Мікробіологічний контроль.....	77
4.10.2. Визначення концентрації біомаси.....	77
4.10.3. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин.	78
4.10.4. Визначення концентрації джерела Карбону і Нітрогену.....	78
4.10.5. Карта постадіного контролю	79
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЧОЇ ФЕРМЕНТАЦІЇ В ПРОЦЕСІ ВИРОБНИЦТВА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН.....	85
6.1. Опис апаратурно-технологічної схеми автоматизації	87
5.2. Завдання на розробку схеми автоматизації.....	88
5.3. Опис функціональної схеми автоматизації	90
5.4. Специфікація на прилади та засоби автоматизації.....	91

PV6211	91
РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	93
6.1. Характеристика та оцінка відходів, утворених при виробництві поверхнево-активних речовин	94
6.2. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів та опис прийомів з їх утилізації	95
6.3. Висновки. Перспективи впровадження систем екологізації даного виробництва.....	98
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	101
ДОДАТКИ.....	113

ВСТУП

Грибкові інфекції або мікози є одними з провідних інфекційних захворювань, що зумовлюють ураження шкіри та інші патології у світі. Сучасні літературні дані вказують на те, що грибковими хворобами шкіри страждає від 5 до 25 % населення, і кількість таких хворих постійно зростає. З метою лікування грибкових інфекцій широко застосовуються різноманітні препарати, більша частина з них – продукти хімічного синтезу, а потреба у протигрибкових препаратах у різних галузях медицини суттєво зростає. Окрім важливого медичного значення патогенні гриби відіграють важливу роль у харчовій промисловості як потенційні забруднювачі продуктів. Псування грибами харчових продуктів має не тільки економічне значення, а й медичне. Причинами цього може бути використання антибіотиків та антисептиків як в медицині, так і харчовій промисловості, а їхнє неправильне та недоцільне застосування призводить до збільшення поширеності різних форм мікозів. Крім того, спостерігається збільшення кількості внутрішньолікарняних мікозів і резистентності патогенних грибків [1].

Неконтрольоване використання антибіотиків, недотримання терапевтичних доз і нераціональний підбір антимікробних речовин є причиною поширення антибіотикорезистентності. Натепер навіть новітні покоління антифунгальних засобів не здатні інгібувати мультирезистентні штами [2].

Для подолання стійкості до антибіотиків або антифунгальних засобів та підвищення ефективності природних антимікробних препаратів використовується комбінація звичайних антимікробних препаратів з природними протимікробними засобами [4]. При цьому натуральні продукти містять різноманітність біоактивних молекул, які були оцінені як потенційні інноваційні терапевтичні засоби, що відіграють надзвичайно важливу роль

					НУХТ БТЕК 04.02.32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бахтій О.Л.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Пирог Т.П.					8	1412
Реценз.		Сухоребра Л.М.				10		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

у відкритті та розробці нових препаратів [3]. Це є одним із перспективних альтернативних стратегій проти інфекційних захворювань, що спричинені резистентними до лікарських засобів мікроорганізмами [4].

Ще у 2016 р. Всесвітня організація охорони здоров'я опублікувала перелік пріоритетних напрямків підвищення ефективності використання антибіотиків, серед яких можливість їх використання у комбінації з іншими природними сполуками. Серед таких речовин природного походження перспективними природними сполуками, які можуть бути використані у комбінації з анрибіотиками, є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) [5].

Незважаючи та значні переваги мікробних ПАР порівняно із синтетичними (низька токсичність, стійкість у широкому діапазоні температур, біодеградабельність, стабільність фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури, екологічна безпечність і т.д.), їх промислове виробництво в Україні на сьогоднішній день не реалізовано. Основними причинами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР, є високі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока продуктивність штамів продуцентів [6].

Саме тому, основним завданням на сьогоднішній день є використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості), оптимізація умов культивування продуцента, пошук нових рентабельних методів виділення й очищення ПАР та одержання мутантних і рекомбінантних штамів мікроорганізмів, які мають здатність до синтезу мікробних поверхнево-активних речовин [6].

Раніше із забруднених нафтою зразків було виділено штам нафтоокислювальних бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та встановлено його здатність до синтезу метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями під час росту на різних гідрофільних та гідрофобних субстратах в тому числі і на відпрацьованій олії [7-8].

Синтезовані штамом *A. calcoaceticus* ІМВ В–7241 ПАР характеризуються антимікробними, антиадгезивними властивостями, здатні до руйнування бактеріальних та дріжджових біоплівки та деструкції нафти.

Варто зазначити, ще серед представників роду представників роду *Acinetobacter* немає потенційних промислових продуцентів ПАР, оскільки їх культивування передбачає використання обмеженої кількості субстратів (зорема гесадекан), а синтезовані метаболіти використовуються тільки у природоохоронних технологіях (деструкція ксенобіотиків) [9].

В той же час штам *A. calcoaceticus* ІМВ В–7241 здатний рости на промислових відходах та синтезує ПАР, які завдяки широкому спектру властивостей є препаратами мультифункціонального призначення і можуть бути використані у багатьох галузях промисловості і медицини для боротьби з резистентними штамми мікроорганізмів, зокрема представниками роду *Candida*. Вони є найперспективнішими антимікробними сполуками, оскільки їх ефективні концентрації є досить низькими (кілька мкг/мл), у тому числі й щодо мультирезистентних патогенів, які втратили чутливість.

Наведені сполуки є нетоксичними і характеризуються цілеспрямованою дією. Більшість з них, крім антимікробної та протигрибкової дії, характеризується антиадгезивними, імуномодулюючими властивостями, проявляє протипухлинну дію, що робить їх набагато привабливішими для подальшого дослідження [10].

Зараз комбінована терапія розглядається як ефективний підхід для підвищення ефективності антимікробної терапії в лікуванні інфекцій. У наш час робиться більше спроб впоратися з різними порушеннями лікування, шляхом комбінування різних протигрибкових препаратів та речовин, що здатні проявляти антифунгальні властивості [11].

Така підвищена резистентність цих збудників зумовлена перш за все обмеженою кількістю сполук для боротьби з ними [12], що вказує на необхідність пошуку препаратів з антифунгальними властивостями, якими можуть стати мікробні поверхнево-активні речовини.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИФУНГАЛЬНОЇ ДІЇ АНТИМІКОТИКІВ З БІОЦИДНИМИ РЕЧОВИНАМИ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Для подолання стійкості до антибіотиків або антифунгальних засобів та підвищення ефективності природних антимікробних препаратів використовується комбінація звичайних антимікробних препаратів з природними протимікробними засобами [4]. При цьому натуральні продукти містять різноманітність біоактивних молекул, які були оцінені як потенційні інноваційні терапевтичні засоби, що відіграють надзвичайно важливу роль у відкритті та розробці нових препаратів [2]. Це є одним із перспективних альтернативних стратегій проти інфекційних захворювань, що спричинені резистентними до лікарських засобів мікроорганізмами [5].

Їх гідною заміною можуть стати такі антимікробні речовини природного походження, як бактеріоцини, поверхнево-активні речовини, лектини та ефірні олії, а також бактеріофаги [13]. Екстракти рослин, пептиди, поверхнево-активні речовини проявляють синергетичну дію щодо мікроорганізмів [11].

Наведені сполуки є нетоксичними і характеризуються цілеспрямованою дією. Більшість з них, крім антимікробної та протигрибкової дії, характеризується антиадгезивними, імуномодулюючими властивостями, проявляє протипухлинну дію, що робить їх набагато привабливішими для подальшого дослідження [13].

1.1 Синергічна дія на мікроорганізми комплексу протигрибкових препаратів та ефірних олій

Ефірні олії – це рідкі екстракти ароматичних рослин, що застосовуються багатьох галузях промисловості. Використання ефірних олій як протимікробних, протипухлинних, протизапальних та противірусних засобів обумовлено їх ефективними та дієвими властивостями, в порівнянні з іншими

					НУХТ БТЕК 04.02.32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бахтій О.Л.			РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИФУНГАЛЬНОЇ ДІЇ АНТИМІКОТИКІВ З БІОЦИДНИМИ РЕЧОВИНАМИ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					11	1142
Реценз.		Сухоребра л.М				13		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

засобами [14].

Ефірні олії мають широкий спектр антибактеріальної, протигрибкової та навіть противірусної дії. Вони здатні інгібувати ріст стійких до ліків мікробних штамів навіть таких, що важко піддаються лікуванню звичайними антибіотиками. Що стосується способу їх дії, то для грибкових збудників ефірні олії утворюють мембранний потенціал по клітинній стінці і порушують формування молекули АТФ, що призводить до пошкодження клітинної стінки [15].

Компонентний склад ЕО досить широкий. Так, у загальному до їх складу входить близько 500 сполук, основними з яких є: терпени (монотерпени та сесквітерпени), терпеноїди (ізопреноїди), аліфатичні й ароматичні сполуки (альдегіди та феноли), спирти, ефіри та кетони, які, в основному, відповідають за біологічну активність ароматичних і лікарських рослин, їх аромат [16].

В *табл. 1.1* наведено декілька досліджень, що показали синергетичну взаємодію між ефірними оліями та антимікотиками, і мали антифунгальний ефект [17].

Наприклад, ефірна олія мелалеука плакуча у поєднанні з антибіотиками призвела до синергетичного ефекту проти дріжджів роду *Candida*. За літературними даними [18] при комбінації протигрибкових засобів підтвердили, що олія володіє фунгіцидними властивостями та має антимікробний вплив на кандіду. При цьому МІК антибіотика в суміші становив 0,4-1,6 мг/мл, що в 2 рази менше ніж застосуванні лише протигрибкового засобу (1,6-3,125 мг/мл).

Синергічний ефект мелалеука плакуча у поєднанні з чотирма протигрибковими препаратами з сімейства азолів показали його здатність застосування, як комбіновану терапію при лікуванні кандидозних інфекцій .

**Антифунгальна активність суміші ефірних олій та протигрибкових препаратів щодо представників роду
*Candida***

Ефірна олія	Антибіотик	Тест-культура	МІК ефірної олії, мг/мл	МІК антибіотику, мг/мл	МІК компонентів у суміші, мг/мл			Література
					ефірної олії	антибіотику	ФІК	
М'ята перцева	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,17	0,08	-	-	0,46	[19]
		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	2,87	0,08	-	-	0,46	
		<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	1,17	0,08	-	-	0,46	
	Флуконазол	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,17	0,08	-	-	0,46	
		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	2,87	1,29	-	-	0,46	
		<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	1,17	0,08	-	-	0,46	
	Міконазол	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,3	0,17	-	-	0,46	
		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	2,87	0,08	-	-	0,46	
		<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	0,3	0,15	-	-	0,16	
Мелалеука плакуча	Флуконазол	<i>Candida albicans</i>	62,5	1,6	6,25	0,4	0,35	[18]
	Еконазол		62,5	3,125	6,25	0,8	0,3	
	Кетоконазол		62,5	6,25	12,5	1,6	0,46	
	Інтраконазол		62,5	3,125	6,25	0,8	0,36	
Обвійник грецький	Флуконазол	<i>Candida albicans</i>	0,937	0,031	-	-	1,25	[17]
		<i>Candida krusei</i>	3,75	0,25	-	-	0,37	
Тимол	Ністатин	<i>Candida albicans</i> CBS 562	39	1,9	4,88	0,24	0,25	[20]
		<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	78	1,9	9,78	0,24	0,25	
		<i>Candida krusei</i> CBS 573	39	1,9	4,88	0,24	0,25	
Чебрець далматський	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i>	125	0,96	15,62	0,06	0,37	[23]
	Ністатин		125	1,92	15,62	0,12	0,37	

Кориця	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i>	62,5	0,96	7,81	0,06	0,37	[23]
	Ністатин		62,5	1,92	7,81	0,24	0,5	
Кориця	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	62,5	2	-	-	0,5	[25]
	Флуконазол			100	-	-	0,37	
Гвоздичне дерево	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	250	2	-	-	0,51	
	Флуконазол			100	-	-	0,5	
Чебрець далматський	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	125	2	-	-	1	
	Флуконазол			100	-	-	0,5	
Пеларгонія ароматна	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	500	2	-	-	1	
	Флуконазол			100	-	-	0,37	
Померанець	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	0,15	0,62	0,018	0,075	0,24	[24]
	Флуконазол			0,15	0,018	0,018	0,24	
	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> MTCC 277	0,31	0,62	0,093	0,018	0,05	
	Флуконазол			0,62	0,075	0,075	0,36	
М'ята перцева	Флуконазол	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,28	1	0,91	0,06	0,46	[26]
		<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126	1,14	16	0,46	1	0,47	
		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	4,54	16	1,82	1	0,46	
		<i>Candida kefyr</i> ATCC 204093	4,54	2,28	1,82	0,25	0,46	

Примітка: «←» дані не наведено.

Ефірна олія м'яти перцевої застосовується для зовнішнього використання як протисвербіжний, антисептичний засіб. У літературних джерелах [19] було показано здатність ефірної олії до протигрибкових властивостей, а саме поєднання засобу з антимікотиками, такі як амфотерицин В, флуконазол, міконазол, що застосовувалися проти штамів *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750.

Використання м'яти перцевої разом з антифунгальними препаратами призвело до зниження ефективної концентрації антибіотику в суміші з олією, при цьому показник фракційної інгібуючої концентрації не перевищував 0,46 мг/мл.

При використанні [17] ефірної олії, отримана з обвійник грецький дослідниками було з'ясовано, що листя мали антиоксидантну та антимікробну активність. Також, при взаємодії сполук антибіотиків з олією отримано синергічну дію проти штамів мікроорганізмів. Крім того, комбінація між ефірною олією та флуконазолом показала синергетичний ефект для всіх дріжджів, крім *C. albicans* (ФІК становив 1,25 мг/мл).

Тимол (2-ізопропіл-5-метилфенол) - це фітоконституент, класифікований як монотерпен. Це основний складовий в ефірній олії чебрецю (*Thymus vulgaris*) і є головним компонентом ефірної олії орегано (*Origanum vulgare*).

Тимол, що міститься в олії тмину, спричиняє антимікробну в результаті порушення синтезу ергостеролу, пошкодження клітинної поверхні та генів, що беруть участь у метаболізмі сірки відповідно. Окрім тимолу, до складу ефірної олії тмину входить карвакрол, що проявляє в основному антифунгальний ефект щодо дріжджів роду *Candida*, порушуючи баланс катіонів Ca²⁺ [21].

Під час експериментальних [20] досліджень виявили, що використання в суміші ністатину та тимолу дає змогу зменшити мінімальну інгібуючу концентрацію від 1,9 до 0,24 мкг/мл у таких мікроорганізмів *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Дослідження показали, що тимол має антисептичні, протизапальні, антиоксидантні та цілющі властивості, широкий спектр біологічної активності.

У роботі [22] описані дослідження, що підтверджують протигрибкову активність ефірних олій шавлії та чебрецю. Антифунгальний потенціал ефірної олії чебрецю продемонстрував повне пригнічення *Fusarium graminearum*. Ріст міцелію при всіх досліджуваних концентраціях та синергічний ефект з шавлією дали можливість зменшити ефективну зону інгібування. У роботі було виявлено, що зона росту міцелію при обробці сумішею олій була в 10 раз менше, ніж при окремому їх застосуванні. Ці результати вказують на позитивний синергічний ефект, який був підтверджений у статті.

Експериментально [23] було показано, що олії чебрецю далматського та кориці теж мають здатність до антифунгальної дії. Так, МІК олій окремо становили для чебрецю мали значення 125 мг/мл, а для кориці – 62,5 мг/мл. При поєднанні олій з антифунгальними препаратами (амфотерицин, ністатин) МІК речовин зменшувалась, а значення фракційної концентрації перебувало в межах 0,37-0,56 мг/мл.

Ефірна олія померанцю використовується в традиційній медицині при лікування болю в шлунку, блювоти, артеріального тиску, дизентерії, діареї, серцево-судинних аналептиків, заспокійливі. Його ефірна олія має антиоксидантну, протимікробну, протигрибкову, протипаразитарну та протизапальну дію. У роботі [24] описано, що ефірна олія виявляла антикандидозну та синергічну активність при поєднанні з флуконазолом та амфотерицином В, а результати показано у *табл. 1.1*.

Олії таких рослин як кориця, гвоздичне дерево, чебрець далматський, пеларгонія ароматна виявляли широкий спектр дії проти різноманітних патогенних штамів *Candida*. Синергетичний ефект спостерігався при комбінаціях олій кориці та пеларгонії ароматної разом з флуконазолом (значення ФІК становило 0,37). Дослідження механізму дії показало, що ефірна олія кориці зменшила кількість ергостеролу у клітині до 83%. Повне пригнічення спостерігалось для комбінації кориці та флуконазолу. При

поєднанні пеларгонії ароматної виявилась здатність порушувати бар'єр проникності клітинної стінки гриба [25].

Проаналізована література про антимікробну активність ефірних олій робить можливість зробити висновок, що ефірні олії володіють унікальними антибактеріальними, протигрибковими та противірусними властивостями та можуть бути використані як протимікробні засоби [15].

Отже, як видно з *табл. 1.1.* при поєднанні ефірних олій таких рослин, як кориця, м'ята, чебрець, гвоздика, цитрус у використанні разом з антифунгальними препаратами дає змогу зменшити мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотика, мінімізує небажані побічні ефекти від його використання та знижує імовірність виникнення резистентних штамів мікроорганізмів.

1.2 Антимікробна активність суміші поверхнево-активних речовин та антифунгальних препаратів

Поверхнево-активні речовини (ПАР) належать до структурно різноманітних сполук, що синтезуються мікроорганізмами і складаються з гідрофільної і гідрофобної частин. Усі мікробні ПАР умовно можна поділити на високомолекулярні (полісахариди, ліпопротеїни), що утворюють міцели і мікроемульсії та низькомолекулярні (ліпопептиди, гліколіпіди, протеїни), що здатні знижувати поверхневий і міжфазний натяг. Низькомолекулярні ПАР, завдяки таким властивостям можуть бути використані як потенційні антивірусні, антимікробні та антифунгальні агенти у медицині, косметології [27].

ПАР виробляються природним чином та є екологічно чистими тому, широко застосовуються як альтернатива синтетичним поверхнево-активним речовинам [28].

У роботі проводилося [29] дослідження синергізму ліпопептиду бациломіцину D в суміші з протигрибковим препаратом амфотерицином B, проти патогенних видів *Candida*. Ліпопептидна поверхнево-активна речовина бациломіцин D була виділена із штаму *B. subtilis* B38. Механізм дії

амфотерицину В заснований на його зв'язуванні з клітинною мембраною грибка ергостеролом, з подальшим продукуванням трансмембранного каналу, що дозволяє витіканню вмісту цитоплазми і, отже, загибелі клітин.

Бациломіцин D пригнічував ріст різних видів *Candida* при мінімальних концентраціях від 12,5 до 25 мкг/мл. Крім того, засіб продемонстрував синергічний ефект з протигрибковим препаратом амфотерицином В у пригніченні росту дріжджів роду *Candida*.

Цікаво, що МІК антибіотику знаходилась в межах 0,25-1 мг/мл, при тому мінімальна інгібуюча концентрація антимікотика для суміші речовин була значно меншою (0,06-0,25 мг/мл).

Таблиця 1.2

Антифунгальна активність суміші поверхнево-активних речовин та протигрибкових препаратів щодо представників родини *Candida*

ПАР, продуцент	Антибіотик	Тест-культура	МІК ПАР, мг/мл	МІК антибіотику, мг/мл	МІК компонентів у суміші, мг/мл			Література
					ПАР	антибіотику	ФІК	
Бациломіцин D, <i>Bacillus subtilis</i> B38	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12.5	0,25	0,39	0,06	0,27	[28]
		<i>Candida tropicalis</i>	25	1	1,56	0,25	0,31	
		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	25	0,5	0,78	0,06	0,27	
		<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 22019	25	0,25	3,12	0,03	0,5	
		<i>Candida glabrata</i> RGa	25	1	3,12	0,12	0,36	
Бациломіцин D, <i>Bacillus subtilis</i> B38	Амфотерицин В	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,39	0,06	-	-	0,07	[30]

Отже, така комбінація баціломіцин D / амфотерицин B може представляти дійсну альтернативу звичайним протигрибковим засобам для місцевого лікування інфекцій *C. albicans* [30].

Таким чином, при використанні суміші поверхнево-активних речовин разом з антифунгальними препаратами, можливо суттєво зменшити мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотиків, для запобігання утворенню резистентних форм мікроорганізмів.

1.3 Синергічна антимікробна активність антимікотиків та інших природних біоцидів

Лектини – це вуглеводнезв’язуючі білки, широко поширені в рослинах і проявляють різноманітну біологічну активність, включаючи антимікробну дію [31]. Лектин, який називають, був виділений із приквіткових листків суцвіття червоного імбиру (*Alpinia purpurata*), родом з островів Тихого океану, але в даний час широко культивується в декількох країнах завдяки своїй здатності безперервно цвісти протягом року, а також завдяки рясності та довговічності квітів.

У дослідженнях [2] було виявлено, що суміш лектину та протигрибкового препарату флуконазол проявляли синергічну дію щодо мікроорганізму *C. parapsilosis*, при цьому МІК антибіотика зменшився від 128 до 0,16 мг/мл, а показний фракційної концентрації не перевищував 0,12 мг/мл.

В той же час, дріжджі *C. albicans* не виявили синергічного ефекту, оскільки ФІК становив 1 мг/мл, зважаючи на це концентрація антибіотика в суміші теж не змінилася.

У роботі [32] гідроалкогольний екстракт мигдалю добре показав свої протигрибкові властивості, оскільки при дослідженнях речовини в суміші та без, екстракт виявляв антифунгальні здібності щодо штамів *C. albicans*. При цьому, зменшилась мінімальна інгібуюча концентрація флуконазолу в суміші та було досягнуто синергічного ефекту.

Діорцинол D похідний дифенилового ефіру гриба *Aspergillus versicolor*, що здатний виявляти фунгіцидну активність.

У дослідженнях [11], що описували взаємодію діорцинолу та флуконазолу, було показано, що мінімальна інгібуюча концентрація речовин в суміші мала нижче значення, ніж при дії речовин по одинці.

МІК антифунгального препарату флуконазол для різних штамів *C. albicans* перебував у межах 0,5-2 мг/мл. При цьому у використанні лікарського засобу разом з діорцинолом інгібуюча концентрація антибіотику становила 0,03-0,5 мг/мл. У такому випадку фракційна концентрація для визначення синергічності речовин перебувала в межах норми, окрім штаму *C. albicans* 11E (1,5 мг/мл), що свідчить про відсутність синергізму.

Псевдоларинова кислота В – дитерпенова кислота, є основним протигрибковим компонентом традиційної китайської трави, відомої як “Ту-Джин-Пі”, який був призначений для лікування грибкові інфекції шкіри з 17 століття. Продемонстровано протигрибкову активність псевдоларинова кислота до клітин *C. albicans*, які стійкі до антимікотиків, демонструючи значний синергетичний ефект, коли він поєднувався з флуконазолом [33, 34].

Було виявлено, що лише псевдоларинова кислота проявляла подібну інгібуючу активність щодо флуконазол-резистентних та флуконазол-сприйнятливих штамів із середнім коефіцієнтом МІК від 8 до 16 мкг / мл. Коли при комбінованому застосуванні синергізм спостерігався у всіх (13/13) стійких до флуконазолу та (2/9) до флуконазол-сприйнятливих штамів, ФІК перебував в діапазоні від 0,070 до 0,375 мг/мл [35].

Більше того, супутнє використання суміші псевдоларинової кислоти і флуконазолу виявило сильний довго залежний синергічний інгібуючий ефект усуваючи понад 80% утворення біоплівки. Було виявлено, що псевдоларинова кислота, відмінна від азолів, може суттєво пригнічувати проростання спор і руйнувати клітину цілісність, яка спричиняє деформацію клітини, набряк, колапс та перфорацію зовнішньої мембрани [35].

Амброксолу гідрохлорид – широко використовується для лікування хронічної хвороби легень, хронічного бронхіту, бронхіальної астми [36].

Амброксол має сильнодіючу відхаркувальну дію та поліпшує дихальну функцію. Цікаво, що лише амброксол у високих концентраціях від 1 до 60 мг/мл демонструє протимікробну дію на *C. albicans*, *C. parapsilosis* [37].

У цьому дослідженні було виявлено, що поєднане лікування флуконазолу та амброксолу призводить до синергетичного ефекту *C. albicans* *in vitro* та *in vivo*. Крім того, ця комбінація також виявила синергетичні ефекти проти стійких біоплівки *C. albicans* на різних стадіях [37].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти досліджень

Об'єктом досліджень був штам *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7241.

Як тест-культури для визначення антифунгальної активності використовували штами дріжджів *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2 та *Candida utilis* БМС-65, з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Як антифунгальні препарати використовувати ті, що входять до складу лікарських засобів для зовнішнього застосування (мазі, креми, препарати для ветеринарії), а саме клотримазол та флуконазол.

Клотримазол — синтетичний протигрибковий препарат, що належить до класу азолів широкого спектра дії. Препарат має як фунгіцидні, так і фунгістатичні властивості, що залежить від концентрації препарату та виду збудника мікозів. Механізм дії клотримазолу полягає в пошкодженні клітинних мембран грибків, пригніченні процесів клітинного дихання, порушенні синтезу тригліцеридів, порушенні трансформації дріжджових грибків в міцеліальні форми. До препарату чутливі грибки *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Trichophyton* spp., *Coccidioides immitis*, *Aspergillus* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium* spp., а також диморфні та вищі гриби. Чутливими до клотримазолу є також трихомонади, частина анаеробів (*Bacteroides* spp., *Gardnerella vaginalis*), стафілококів, стрептококів та коринебактерій [38].

					НУХТ БТЕК 04.02.32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бахтій О.П.			РОЗДІЛ 2. МАТЕРІЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					22	1712
Реценз.		Сухоребра Л.М.				24		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Флуконазол — синтетичний протигрибковий препарат, що відноситься до класу азолів широкого спектра дії. Препарат має як фунгістатичну, так і фунгіцидну дію, що залежить від концентрації препарату в крові. Механізм дії флуконазолу полягає у інгібуванні синтезу стеролів у клітинах грибків, що приводить до пошкодження клітинних мембран грибків. До препарату чутливі грибки *Candida spp.*; *Cryptococcus neoformans*; *Microsporium spp.*; *Trichophyton spp.*; *Blastomyces dermatitides*; *Coccidioides immitis*; *Histoplasma capsulatum*. До препарату нечутливі збудники роду *Aspergillus* [39].

2.2 Культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на промислових відходах

Штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 вирощували у рідких мінеральних середовищах з різним вмістом катіонів-інгібіторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази.

Раніше, у роботах [40, 41] дослідниками, було встановлено залежність антимікробних властивостей ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 від умов культивування продуценту. Це може бути обумовлено тим, що мікробні ПАР є вторинними метаболітами і, як правило, синтезуються у вигляді комплексу подібних з'єднань [42], співвідношення яких може змінюватися в різних умовах культивування продуцентів, що супроводжується зміною біологічних властивостей цільового продукту.

Пізніше було встановлено [43], що катіони калію та натрію в високих концентраціях є інгібіторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, а в нижчих концентраціях - активаторами цього ферменту, а також ФЕП-карбоксікінази та ФЕП-синтетази. Підвищення концентрації біоповерхнево-активної речовини до 6,1–7,7 г / л під час культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 в середовищі №1 та №3 було обумовлено переважним синтезом гліколіпідів та збільшення в 1,8 У -6,5 разів активності ФЕП-карбоксілази, ФЕП-карбоксікінази, ФЕП-синтетази та трегалози фосфат синтетази.

У роботі було показано, що ПАР, синтезовані на базовому середовищі, характеризувались найвищою антимікробною активністю. При дослідженні

антиадгезивних властивостей, ПАР, що отримані на базовому середовищі, мали нижчий показник адгезії в середньому на 10–20%, ніж після поверхневої обробки ПАР, синтезованим у модифікованих середовищах (45-66%)

Отже, відповідно до проаналізованої літератури було обрано склад поживного середовища для культивування *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, з метою пошуку поверхнево-активних речовин, що мають найвищі показники антифунгальних властивостей.

Склад поживного середовища, (г/л):

Базове середовище: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; **NaCl – 1,0**;
 Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14

Середовище 1: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; Na_2HPO_4 – 0,6;
 KH_2PO_4 – 0,14

Середовище 2: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; **NaCl – 2,0**;
 Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14

Середовище 3: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; **NaCl – 1,0**; **KCl – 1,0**;
 Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14

Джерело вуглецю: відпрацьована олія (після смаження картоплі фри) – 2 % (об'ємна частка).

Посівний матеріал вирощували на базовому середовищі, відпрацьована олія (після смаження картоплі) – 0,5 % (об'ємна частка).

У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка), (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; H_3BO_3 – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) – 0,5 [44].

Інокулянт, в якому чисельність бактерій становила 10^4 – 10^5 кл/мл, вносили у кількості 10 % від об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах на качалках (320 об/хв, t 30 °C) впродовж 120 год.

2.3 Визначення концентрації поверхнево-активних речовин

Кількість синтезованих позаклітинних ПАР (г /л) визначали гравіметрично після екстракції з культуральної рідкої надосадової рідини із сумішшю Фолча.

Для отримання супернатанту постферментаційну культуральну рідину центрифугували упродовж 45 хв (5000 g). Для екстракції ПАР у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл вносили 25 мл супернатанту і 25 мл суміші Фолча, струшували (для екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції як описано вище і отримували органічний екстракт 2. Аналогічно здійснювали третій етап екстракції, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1–3 упарювали на роторній випарній установці ИР-1М2 при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси. [45, 46].

Після екстракції концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом [46].

Концентрація ПАР, отриманих на:

- Базовому середовищі – **3,6 г/л**;
- Середовищі 1 – **6,08 г/л**;
- Середовищі 2 – **2,36 г/л**;
- Середовищі 3 – **7,7 г/л**.

2.4 Визначення антифунгальної активності ПАР

Антифунгальну активність ПАР аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [47].

Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у рідкому суслі для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл розчину ПАР певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній

пробірці становив 1 мл (сусло і розчин ПАР), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці знижувалася у 2 рази. Як контроль використовували 1 мл МПБ або сусла без додавання розчину ПАР. Далі у кожному з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 – 10^6 КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28–30 °С для бактерій та 24–26 °С для дріжджів.

Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР, визначали як значення концентрації ПАР в першій пробірці, де ріст був відсутній [47].

Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації було зроблено відповідні розведення препаратів поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB В-7241 (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Розведення поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB В-7241 для дослідження мінімальної інгібуючої концентрації

Розведення препаратів (мкг/мл)				
ПАР на	Базовому середовищі (3,6 г/л)	Середовищі 1 (6,08 г/л)	Середовищі 2 (2,36 г/л)	Середовищі 3 (7,7 г/л)
1	180	304	118	385
2	90	152	59	195,5
3	45	76	29,5	96,2
4	22,5	38	14,75	48,1
5	11,25	19	7,37	24
6	5,625	9,5	6,68	12
7	2,81	4,75	1,84	6
8	1,4	2,378	0,92	3

2.5 Визначення антифунгальної активності протигрибкових препаратів.

Для визначення антифунгальної активності протигрибкових засобів використовували метод, що наведений вище, за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [47].

Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації було зроблено відповідні розведення протигрибкових препаратів клотримазолу та флуконазолу (*табл. 1.2*).

Таблиця 2.2

Розведення антифунгальних засобів для дослідження мінімальної інгібуючої концентрації

Розведення препаратів (мкг/мл)		
№	Клотримазол	Флуконазол
1	500	150
2	250	75
3	125	37,5
4	62,5	18,75
5	31,25	9,375
6	16,6	4,6875
7	7,8	2,34
8	3,9	1,17

2.6 Визначення синергічної активності суміші поверхнево-активних речовин та антифунгальних засобів

Методи визначення синергізму антифунгальної дії [48]. Для визначення синергізму антимікробної дії спочатку визначають мінімальну інгібуючу концентрацію для кожної сполуки окремо. Для визначення МІК суміші використовують розчини антибіотику та ПАР з концентрацією у 2 рази меншою, ніж значення МІК кожного з монопрепаратів, а співвідношення розчинів обох антимікробних сполук становить 1:1. В одному з варіантів концентрація антибіотику в суміші залишається незмінною, а концентрацію ПАР зменшують методом послідовних двократних розведень, в іншому –

навпаки (концентрацію ПАР не змінюють, а антибіотику знижують).

Для визначення синергізму антимікробної дії використовували показник фракційної інгібуючої концентрації (ФІК):

$$\text{ФІК} = (K_A / \text{МІК}_A) + (K_B / \text{МІК}_B),$$

де: $K_{A,B}$ – концентрація антимікробної сполуки А і В в суміші;

$\text{МІК}_{A,B}$ – мінімальна інгібуюча концентрація антимікробної сполуки А і В.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3—5. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

**РОЗДІЛ 3. АНТИФУНГАЛЬНА АКТИВНІСТЬ СУМІШІ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER
CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 ТА ПРОТИГРИБКОВИХ ПРЕПАРАТІВ**

3.1 Антифунгальна активність поверхнево-активних речовин

***Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241**

Експериментально отримані результати мінімальних інгібуючих концентрацій поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 наведені в *табл. 2.1* відповідно до попередньо вказаних розведень препаратів (*табл. 2.1*).

Таблиця 3.1

Мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо дріжджів роду *Candida*

МІК поверхнево-активних речовин мкг/мл				
№	ПАР синтезовані на	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	<i>Candida utilis</i> БМС-65
1	Базове середовище (3,6г/л)	180	180	90
2	Середовище 1 (6,08г/л)	76	76	152
3	Середовище 2 (2,36г/л)	29.5	29.5	29.5
4	Середовище 3 (7,7г/л)	48.125	48.125	48.125

Як показано з *табл. 3.1* максимальне значення МІК ПАР становило 180 мкг/мл (для *Candida albicans* Д-6) при цьому поверхнево-активні речовини були синтезовані на базовому середовищі, без додаткового внесення катіонів Натрію та Калію. Найнижчий показник мінімальної концентрації було встановлено внесені ПАР (2,36 г/л), тобто поверхнево-активні речовини, що

					НУХТ БТЕК 04.02.32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бахтій О.П.			РОЗДІЛ 3. АНТИФУНГАЛЬНА АКТИВНІСТЬ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241 ТА ПРОТИГРИБКОВИХ ПРЕПАРАТІВ	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					29	1712
Реценз.		Сухоребра Л.М.				Кафедра БТМ 31		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

були синтезовані в середовищі з додатковим внесенням NaCl.

3.2 Антифунгальна активність протигрибкових засобів

Результати мінімальних інгібуючих концентрацій протигрибкових препаратів наведені в *табл. 3.2* відповідно до попередньо вказаних розведень препаратів (*табл. 2.2*).

Таблиця 3.2

Мінімальні інгібуючі концентрації антифунгальних препаратів щодо дріжджів роду *Candida*

МІК протигрибкових засобів мкг/мл				
№	Антимікотики	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	<i>Candida utilis</i> БМС-65
1	Клотримазол	-	3,9	62,5
2	Флюконазол	4,6875	1,17	1,17

У *табл. 3.2* отримано результати, що МІК препаратів флюконазол і клотримазол не були високої концентрації, а знаходилися в межах (1,17 мкг/мл – 62,5 мкг/мл). Також антифунгальний засіб клотримазол не проявив протигрибкової дії на *Candida albicans* Д-6, це може бути обумовлене виникненням резистентності даного виду дріжджів до лікарського засобу.

3.3 Синергізм антифунгальної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 з препаратом клотримазолом

Встановлено, що при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відпрацьованій соняшниковій олії після смаження картоплі фрі, поверхнево-активні речовини проявляли антифунгальний ефект щодо дріжджів роду *Candida*.

Результати показали, що при використанні ПАР разом з протигрибковим препаратом клотримазол показник фракційної інгібуючої концентрації становив <0,05. Це значення вказує на присутність синергізму при застосуванні суміші препаратів. Однак, як вказано в *табл. 2.3*, ФІК комбінації препаратів ПАР (що синтезовані на середовищі 3, концентрація 7,7 г/л) та клотримазолу для таких мікроорганізмів *C. tropicalis* PE-2 і *C. utilis* БМС-65

перевищував значення 0,5, та становив 9 і 1,1, відповідно. Такий результат вказує на відсутність синергізму при використанні суміші речовин.

Дослідження також показали позитивний результат при зменшенні МІК протигрибкового препарату. Наприклад, при використанні комбінації речовин (ПАР 3,6 г/л та клотримазолу) для *C. albicans* Д-6 вдалося понизити мінімальну інгібуючу концентрацію. А саме при застосуванні лише клотримазолу його МІК становив 12 мкг/мл, на відмінну від суміші засобів, які мали менше значення (8,5 мкг/мл).

При цьому, аналіз літератури показав, що клотримазол також проявляє синергічний ефект з ефірними оліями [49] лаванди та розмарину. У роботі було доведено, що ефірні олії, які застосовуються разом з клотримазолом, забезпечують пролонговану дію протигрибкового засобу та є перспективною стратегією проти місцевого кандидозу.

Також є випадки застосування клотримазолу з високомолекулярним хітозаном [50]. Інгібування росту *Candida glabrata* досягало щонайменше 90%, незалежно від вагового співвідношення препарат / допоміжна речовина, і навіть при половині мінімальних інгібуючих концентрацій клотримазолу. Результати демонструють, що клотримазол та високомолекулярний хітозан можуть бути ефективною комбінацією у місцевій протигрибковій композиції.

Проти резистентності дріжджів до лікарських засобів також застосовують комбінацію протигрибкових препаратів. Наприклад [51], поєднання клотримазолу та флуконазолу призвело до часткового синергізму та зменшення метаболічної активності *C. albicans*.

Таким чином, дана робота є першою по використанню поверхнево-активних речовин разом з клотримазолом для підвищення антифунгальних властивостей препаратів.

Таблиця 3.3

Антифунгальна дія поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, клотримазолу та їх суміші

ПАР	Тест-культура	МІК (мкг/мл)				ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		ПАР	Клотримазол	ПАР в суміші з клотримазолом**	Клотримазол в суміші з ПАР*	
Базове середовище (3,6г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	180	12	1,4	8,5	0,0757
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	180	3,9	2,81	38	0,118
	<i>C. utilis</i> БМС-65	90	62,5	1,4	16,6	0,28
Середовище 1 (6,08г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	76	125	4,75	16,6	0,2
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	76	3,9	4,75	31,25	8,08
	<i>C. utilis</i> БМС-65	152	62,5	4,75	16,6	0,05
Середовище 2 (2,36г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	29.5	125	14,75	31,25	0,75
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	29.5	3,9	14,75	31,25	0,75
	<i>C. utilis</i> БМС-65	29.5	62,5	7,37	31,25	0,75
Середовище 3 (7,7г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	48.125	125	3	16,6	0,195
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	48.125	3,9	385	125	9
	<i>C. utilis</i> БМС-65	48.125	62,5	48,1	16,6	1,1

Примітка: під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5%; табл. 2.1 та 2.2: * — концентрація протигрибкового препарату залишалася незмінною, а концентрацію ПАР зменшували методом послідовних двократних розведень, ** — концентрація ПАР залишалася незмінною, а концентрацію протигрибкового препарату знижували методом послідовних двократних розведень.

3.4 Синергізм антифунгальної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 з препаратом флуконазолом

У дослідженнях з використанням флуконазолу (табл. 3.4) синергізм проявлявся гірше. Так наприклад коефіцієнт ФІК коливався від 0,139 до 19,08, що свідчить про відсутність синергізму між речовинами.

Однак, для *C. albicans* Д-6 при застосуванні суміші препаратів ПАР (синтезовані на різних середовищах) та флуконазолу показник фракційної інгібуючої концентрації становив 0,265, 0,476, 0,265, 0,312 відповідно до ПАР.

При цьому і спостерігалось зменшення мінімальної інгібуючої концентрації протигрибкового препарату в суміші в порівнянні з використанням лише флуконазолу (1,17 мкг/мл – для суміші речовин; 4,68 – при використанні лише антимікотика).

Також синергізм спостерігали і при використанні ПАР (6,08 г/л) з флуконазолом для *C. tropicalis* РЕ-2, оскільки показник фракційної інгібуючої концентрації становив 0,139, що знаходиться в заданих межах

Разом з флуконазолом для збільшення протигрибкової дії застосовують лікофелон, що є інгібітором простагладиду [52]. Комбінація двох препаратів пригнічувала утворення біоплівки *C. albicans* протягом 12 годин.

У роботі [53] в основному досліджували лише глабридин, особливо в поєднанні з флуконазолом проти *Cryptococcus neoformans* та видів *Candida*. Глабридин - основний активний ізофлаван, виділений із *Glycyrrhiza glabra*. Після поєднання з препаратів було виявлено потужний синергічний ефект проти стійких до лікарських засобів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Отже, проаналізувавши літературні дані, можна стверджувати, що дослідження синергізму поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 разом з антифунгальними препаратами були першими. Подібні відомості в літературі відсутні.

Таблиця 3.4

Антифунгальна дія поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, флуконазолу та їх суміші

ПАР	Тест-культура	МІК (мкг/мл)				ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		ПАР	Флуконазол	ПАР в суміші з флуконазолом**	Флуконазол в суміші з ПАР*	
Базове середовище (3,6г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	180	4,68	2,81	1,17	0,265
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	180	1,17	1,4	2,34	2,007
	<i>C. utilis</i> БМС-65	90	1,17	5,625	18,75	19,08
Середовище 1 (6,08г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	76	4,68	4,75	1,17	0,476
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	76	1,17	9,5	18,75	0,139
	<i>C. utilis</i> БМС-65	152	1,17	4,75	2,34	2,03
Середовище 2 (2,36г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	29.5	4,68	6,68	1,17	0,265
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	29.5	1,17	14,75	4,68	4,05
	<i>C. utilis</i> БМС-65	29.5	1,17	7,37	2,34	2,08
Середовище 3 (7,7г/л)	<i>C. albicans</i> Д-6	48.125	4,68	3,0	1,17	0,312
	<i>C. tropicalis</i> РЕ-2	48.125	1,17	12,0	9,3	8,01
	<i>C. utilis</i> БМС-65	48.125	1,17	48,1	18,75	19,04

Примітка: під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5%; табл. 2.1 та 2.2: * — концентрація протигрибкового препарату залишалася незмінною, а концентрацію ПАР зменшували методом послідовних двократних розведень, ** — концентрація ПАР залишалася незмінною, а концентрацію протигрибкового препарату знижували методом послідовних двократних розведень.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241

4.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

До синтезу низькомолекулярних поверхнево-активних речовин здатні представники роду *Bacillus* (ліпопептидні ПАР) та *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pseudozyma*, *Candida* (гліколіпідні) [54]. У 2009 році з'явилися повідомлення про здатність до синтезу низькомолекулярних ПАР і представниками роду *Acinetobacter* [55].

Для вибору біологічного агента доцільно порівняти склад поживного середовища, умови культивування та концентрацію синтезованих поверхнево-активних речовин.

Загальну характеристику технологічних особливостей культивування різних штамів роду *Acinetobacter* як продуцентів ПАР наведено в *табл. 4.1*.

Так, згідно даних таблиці 5.2 найвищу концентрацію цільового продукту синтезують штами *A. baumannii* MN3 (г/л) та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 – 4,68 та 3,9 г/л відповідно за 120 год культивування. Не зважаючи на вищу концентрацію утворених ПАР штамом MN3, останній росте на середовищі, що містить як джерело вуглецю сахарозу [56] в той час як культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюють на середовищі, що містить, відпрацьовану після смаження картоплі фрі соняшникову олію. Даний відхід харчового виробництва є дешевим і доступним субстратом, використання якого у технології отримання мікробних метаболітів вирішує ще й проблему його утилізації.

					НУХТ БТЕК 04.02.32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бахтій О.П.			РОЗДІЛ 4. ДІЛЯНКА ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i>	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					35	212
Реценз.		Сухоребра Л.М.				37		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Найменша кількість синтезованих ПАР отримана штамом *Acinetobacter* sp D-3-2 при рості на олії 0,52 г/л протягом 168 год [57], тому розглядати цей штам як продуцента не доцільно.

Проте такої порівняльної характеристики не достатньо для вибору біологічного агента, тому необхідно враховувати і вартість поживного середовища (табл. 4.2) для культивування продуцентів ПАР.

Порівняльна характеристика продуцентів поверхнево-активних речовин

Біологічний агент	Склад ПС, г/л	Конц. ПАР, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Виділення ПАР	Використана література
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Відпрацьована олія після смаження картоплі фри – 40; (NH ₂) ₂ CO – 0,35; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1; NaCl – 1,0; Na ₂ HPO ₄ – 0,6; KH ₂ PO ₄ – 0,14; дріжджовий автолізат – 0,25; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,011; MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,006; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,001; CuSO ₄ ·5H ₂ O – 0,00004; CoSO ₄ ·7H ₂ O – 0,0003; H ₃ BO ₃ – 0,00006; KI – 0,000001; ЕДТА – 0,005.	3,9	pH 6.8–7.0, t=30 ⁰ C 320 об/хв., тривалість культивування 120 год	Кількість позаклітинних ПАР визначали ваговим методом, після екстракції сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2: 1) з супернатанту культуральної рідини	Pirog T. P., Shulyakova M. O., Nikituk L. V., Antonuk S. I., Elperin I. V. Industrial waste bioconversion into surfactants by <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMV Ac-5017, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMV B-7241 and <i>Nocardia vaccinii</i> IMV B-7405. <i>Biotechnologia Acta</i> . 2017, 10(2), 22-33
<i>Acinetobacter</i> sp. D-3-2	Рослинна олія – 10, NaCl – 3; Na ₂ HPO ₄ – 3; KH ₂ PO ₄ – 2; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 5; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,7; CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,002; FeCl ₃ – 0,03; MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,0005; CuSO ₄ – 0,0005; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,001	0,52	pH = 7,0–7,2 t=30 ⁰ C 1200 об/хв., тривалість культивування 168 год	Кількість позаклітинних ПАР визначали ваговим методом, після екстракції етилацетатом, з супернатанту культуральної рідини у співвідношенні 1:1	Bao M., Pi Y., Wang L., Sun P. Lipopeptide biosurfactant production bacteria <i>Acinetobacter</i> sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil. <i>Environ. Sci. Process. Impacts</i> 2014, 16: 897–903.
<i>A. baumannii</i> MN3	Сахароза – 40, сечовина – 10, MgSO ₄ – 0,2 CaCl ₂ – 0,02, KH ₂ PO ₄ – 1,0 K ₂ HPO ₄ – 1,0, NH ₄ NO ₃ – 1,0, FeCl ₃ ·6H ₂ O – 0,5	4,68	pH = 7, t=40 ⁰ C, тривалість культивування 120 год	Супернатант підкислювали до pH 2,0 за допомогою HCl і залишали для осадження ПАР, які віділяли центрифугуванням. Отриманий неочищений розчин ПАР суспендували у деіонізованій воді та екстрагували дихлорметаном тричі. Шар розчинника збирали та випарювання, сухий залишок ПАР зважували	Parthipan P, Elumalai P, Sathishkumar K, Sabarinathan D, Murugan K, Benelli G, Rajasekar A. Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by <i>Pseudomonas stutzeri</i> NA3 and <i>Acinetobacter baumannii</i> MN3. <i>Biotech</i> . 2017;7(5):278.

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *A. baumannii* MN3

Продуцент	Компонент ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Відпрацьована олія – 40	9	0,36	1
	(NH ₂) ₂ CO – 0,35	25	0,00875	2
	NaCl – 1,0	15	0,015	3
	Na ₂ HPO ₄ – 0,6	13,25	0,00795	2
	KH ₂ P0 ₄ – 0,14	21,8	0,003052	4
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,1	63	0,0063	5
	дріжджовий автолізат – 0,25	990	0,2475	10
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O – 0,011	32	0,000352	5
	MnSO ₄ · H ₂ O - 0,006	27	0,000162	5
	FeSO ₄ · 7H ₂ O - 0,001	20	0,00002	11
	CuSO ₄ · 5H ₂ O - 0,00004	110	0,0000044	11
	CoSO ₄ · 7H ₂ O - 0,0003	790	0,000237	5
	H ₃ BO ₃ - 0,00006	60	0,0000036	11
	KI - 0,000001	895	0,0000009	5
	ЕДТА - 0,005	65	0,00325	5
Вартість 1 л ПС = 0,66 грн				
<i>Acinetobacter</i> <i>sp.</i> D-3-2	Рослинна олія – 10	30	0,3	6
	NaCl – 3	15	0,045	3
	Na ₂ HPO ₄ – 3	13,25	0,03975	2
	KH ₂ P0 ₄ – 2	21,8	0,0436	4
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 5	25	0,125	2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,7	63	0,0441	5
	CaCl ₂ · 2H ₂ O – 0,002	133,2	0,00027	8
	FeCl ₃ · 6H ₂ O – 0,03	110	0,0033	5
	MnSO ₄ · H ₂ O – 0,0005	27	0,0000135	5
	CuSO ₄ · 5H ₂ O – 0,0005	45	0,00004	2
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O – 0,001	32	0,00008	5
	Вартість 1 л ПС = 0,6 грн			
<i>A. baumannii</i> MN3	Сахароза – 40	14	0,56	1
	сечовина – 10	25	0,25	2
	MnSO ₄ – 0,2	19,9	0,00398	5
	CaCl ₂ – 0,02	15	0,0003	8
	KH ₂ P0 ₄ – 1,0	21,8	0,0218	4
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	55	0,055	11
	NH ₄ NO ₃ – 1,0	10,8	0,0108	5
	FeCl ₃ · 6H ₂ O – 0,5	110	0,055	5
Вартість 1 л ПС = 0,96 грн				

Примітка. * - ціни наведено станом на березень 2020 року. 1. <https://www.olx.ua/>; 2. <https://russian.alibaba.com/>; 3. <https://produktoff.com/>; 4. <https://agro-smart.com.ua/>; 5. <https://pro-m.ua/Mgso4-7h2o.html>; 6. <https://www.systopt.com.ua/>; 7. <https://ua.korrespondent.net/tag/46385/>; 8. <https://harkiv-torg.com.ua/>; 9. <https://novohim.com.ua/>; 10. <https://euroimpex.net.ua/>; 11. <https://him-component.com.ua/>

Згідно даних *табл. 4.2* найнижча вартість поживного середовища для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за рахунок відпрацьованої олії, трошки вищу вартість має середовище для *A. baumannii* MN3 (1,9 грн), і найвищу – для *Acinetobacter sp.* D-3-2 – 0,96 грн.

Для остаточного вибору продуцента доцільно розрахувати умовну вартість 1 г цільового продукту (*табл. 4.3*), згідно якої вартість 1 г ПАР для *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 становить 0,17 грн, а для *A. baumannii* MN3– 0,205 грн.

Таблиця 4.3

Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *A. baumannii* MN3

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ПАР, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР за 1 год, г/год
<i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	0,66	3,9	0,17	120	0,0325
<i>A. baumannii</i> MN3	0,96	4,68	0,205	120	0,039

Отже, можна зробити висновок, що для синтезу ПАР доцільніше використовувати штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Хоча кількість синтезованих ПАР є меншою (3,9 г/л), у порівнянні з *A. baumannii* MN3(4,68 г/л), однак вартість поживного середовища як і умовна вартість 1 г цільового продукту є нижчою. Тому для отримання мікробних ПАР доцільніше буде використовувати *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

4.2 Техніко-економічне обґрунтування

4.2.1. Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проєкті пропонується використання поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IBM-7241 з антифунгальною активністю, для дослідження синергізму разом з протигрибковими препаратами, щ використовуються в ветеринарії.

Характеристика грибкових захворювань

В Україні, як і в усьому світі, останніми роками спостерігається помітне збільшення захворюваності на мікози. Ці хвороби не спричинюють значну летальність серед хворих, проте збудники грибкових інфекцій зумовлюють високий рівень захворюваності сприйнятливих видів тварин, що представляє особливу епідеміологічну небезпеку для людини [59].

Дерматофітози (дерматомикози) дрібних домашніх тварин – це хвороби грибкової етіології, що характеризуються ураженням шкіри та її похідних. Дерматомикози викликаються різними збудниками трихофітії, мікроспорії і фавусу. До цих збудників належать *Microsporum canis*, *Microsporum aspergillus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*.

Багато мікозів мають важливе епідеміологічне значення, тому що ними хворіють і люди, заражаючись від тварин. На території України відмічається тенденція до зростання захворюваності дерматофітозами. Щорічно приріст великої кількості хворих у великих містах досягає 8,1%. При цьому відзначене двадцятиразове збільшення частоти виявлення цього дерматомикозу у дітей [60].

Осередок тривалої грибкової інфекції викликає: виражену сенсibiliзацію організму; розвиток алергічних реакцій; хронізацію захворювань шкіри; приєднання бактеріальних інфекцій. Основні збудники грибкових захворювань шкіри викликають алергізацію організму антигенами міцелію і токсинами [61].

Для лікування мікозів використовують різноманітні асоційовані вакцини, протигрибкові антибіотики та поверхневу обробку шкіри. Та з кожним роком

дані інфекційні хвороби все гірше піддаються лікуванню. Бувають випадки коли тварину лікують протягом 6 – 7 місяців без видимих покращень [62].



Рис. 4.1 Особливості перебігу дерматофітозів у домашніх тварин

Більшість протигрибкових препаратів мають побічну дію, та деякі характеризуються значною токсичністю. Тривалість терапії грибкових інфекцій іноді досягає 3—4 тижнів, що створює додаткові незручності для пацієнта, порушується графік застосування препарату і, як наслідок, — низька ефективність лікування [61].

Крім того, традиційна фармакотерапія мікозів часто призводить до появи резистентних штамів патогенних мікроорганізмів, алергічних проявів і порушень нормального біоценозу. Незважаючи на велику кількість препаратів, що використовуються для місцевої протигрибкової дії, не можна вважати цю проблему до кінця вирішеною. Багато із запропонованих фунгіцидних та фунгістатичних препаратів представлені імпортними виробниками, вони синтетичні і доволі дорогі [63].

На ринку України представлена велика кількість ветеринарних протигрибкових препаратів. У *табл 4.4* представлені різні антифунгальні препарати, що наразі використовуються для лікування широкого спектру грибкових інфекцій. Серед них найчастіше використовуються такі як клотримазол, ністатин, міконазол. Також ефективними є імпортні синтетичні препарати, такі як енілконазол.

Антифунгальні препарати, що використовуються у ветеринарії

Препарат	Діюча речовина	Кількість діючої речовини		Спектр	Тварини	Ціна, грн	Застосування	Джерело
		на препарат (г)	на 100 г					
Противірибкова емульсія мазь 200 г, <i>Харківська Державна Біологічна фабрика</i>	Декаметоксин	0,2	0,1	Дерматофіти, дріжджові гриби і цвілеві гриби (роду <i>Candida</i> , <i>Torulopsis glabrata</i> , роду <i>Rhodotorula</i> , <i>Malassezia furfur</i>), збудників різнобарвного лишая, еритразми.	велика рогата худоба, вівці, кози, собаки, коти	54-78,5	На шкіру наносять тонкий шар противірибкової емульсії 2-3 рази на добу. Період лікування становить 7-10 днів.	[64]
	Клотримазол	2	1					
Мікосепт спреї 10 мл	Клотримазол,	0,1	1	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton verrucosum</i> . <i>Epidermophyton floccosum</i> . <i>Microsporium canis</i> . <i>Microsporium aspergillus</i> , дріжджових грибів (роду <i>Candida</i> , <i>Torulopsis glabrana</i> , роду <i>Rhodotorula</i>), збудників різнобарвного лишая.	собаки, кішки	15-25	1-2 рази на добу до повного зникнення (7 - 14 діб)	[65]
	Кислота саліцилова,	0,07	0,7					
	Наповнювач	10	100					
Санодерм мазь 15 г, <i>Київмедпрепарат</i>	Бетаметазону дипропіонат,	0,0096	0,064	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Malassezia furfur</i> .	собаки, кішки	60-90	Крем наносять тонким шаром на уражені ділянки шкіри 2 рази на добу. Курс лікування 2-4 тижні.	[66]
	Гентаміцину сульфату,	0,015	0,1					
	Клотримазол,	0,15	1					
	Нипагін	0,03	0,2					

Клотримазол-Вет мазь 50 г, <i>Укрветбіофарм</i>	Клотримазол	0,5	1	Дерматофіти (<i>Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton floccosum</i>); гриби <i>Candida albicans</i> , цвілеві і інші гриби, що викликають мікози шкіри.	собаки, кішки	34	1-2 рази на добу. Тривалість лікування залежить від тяжкості ураження шкіри (7 - 14 діб).	[67]
Імаверол розчин 100 мл « <i>Eli Lilly and Company</i> »	Енілконазол	10	10	<i>Trichophyton verrucosum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton enuinum, Microsporum canis</i> і <i>Microsporum cynipseum</i> .	велика рогата худоба, коні, собаки і кішки	800	Лікування тварини проводять курсом з чотирьох обробок з інтервалом 3-4 дня.	[68]
Триосан крем 20 г <i>Укрзооветпром постач</i>	Ексаметозон	0,0128	0,064	<i>Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Epidermophyton floccosum, Microsporum canis, Candida albicans, Malassezia furfur.</i>	коні, собаки, кішки	48	Крем наносять на уражені ділянки шкіри 1-2 рази на добу. Курс лікування 2-4 тижні	[69]
	Ципрофлоксацин гідрохлорид	0,2	1					
	Клотримазол	0,2	1					
Стоп лишай і грибок спрей 30 мл <i>O.L.KAR. ФАРМ-СЕРВІС</i>	Клотримазол Екстракт прополісу диметилсульфоксид гліцерин спирт ізопропіловий вода дистильована	0,9	3	Препарат володіє вираженою фунгіцидною дією по відношенню до збудників трихофітії і мікроспорії собак та котів.	собаки, кішки	59	Препарат наносять на шкіру з розрахунку 0,2-0,3 мл на 1 кг маси тіла тварини. 1 раз на добу протягом 10-15 діб.	[70]
Сан Д крем 20 г <i>O.L.KAR. ФАРМ-СЕРВІС</i>	Бетаметазона дипропионат,	0,0128	0,064	<i>Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Epidermophyton floccosum, Microsporum canis, Candida albicans, Malassezia furfur</i>	собаки, кішки	42	1-2 рази на добу. Курс лікування становить 2-4 тижні.	[71]
	Гентаміцину сульфат,	0,02	0,1					
	Клотримазол	0,2	1					

Не зважаючи на доволі низьку ціну вітчизняних лікарських засобів, не контрольоване використання антибіотиків та антифунгальних препаратів є причиною збільшення кількості резистентних мікроорганізмів.

Згідно літературних джерел мінімальна інгібуюча концентрація антибіотиків, що використовуються для лікування мікозів збудниками яких є *C. albicans*, *C. tropicalis* та *C. utilis* складають для клотримазолу – 4-8 мкг/мл [72], для ністатину 7-8 мкг/мл, для міконазолу 25 мкг/мл [73].

Для зменшення концентрації таких препаратів їх використовують у суміші з іншими речовинами, наприклад мікробними поверхнево-активними речовинами, що проявляють антифунгальні властивості.

Раніше було встановлено здатність *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В–7241 до синтезу метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями під час росту на різних гідрофільних та гідрофобних субстратах в тому числі і на відпрацьованій олії [74, 75]. Синтезовані штамом *A. calcoaceticus* ІМВ В–7241 ПАР характеризуються антимікробними властивостями щодо бактеріальних та дріжджових тест-культур.

При цьому значення мінімальних інгібуючих концентрацій поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В–7241, отриманих на середовищі з олією після смаження картоплі «фрі», щодо представників роду *Candida* (*C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2 та *C. utilis* БМС-1) становить 58 мкг/мл [74]. Перевагою ПАР є унікальний механізм антифунгальної дії, що унеможливорює появу резистентних форм патогенних дріжджів (на відміну від клотримазолу).

Для зменшення значення МІК антифунгальних препаратів пропонується використання поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В–7241 на середовищі з олією після смаження картоплі «фрі». Використання такого субстрату дасть змогу не лише отримати метаболіти з високими антифунгальними властивостями, а й здешевити технологію їх отримання.

4.2.2 Розрахунок річної потреби

Згідно даних комунального підприємства «Центр поводження з тваринами» у місті Харкові було виявлено, що в період з 2012 по 2018 роки на дерматофітози захворіло 615 гол. котів та 231 гол. собак [76]. За державною та міжнародною статистикою кількість хворих на дерматофітози тварин серед котів (різних порід) щороку збільшується від 2,1 % до 88,4 %, серед собак від 2,6 до 66,7 % [77].

Так як дані про кількість хворих тварин за 2019-2020 роки на базі підприємства «Центр поводження з тваринами» відсутні та з врахуванням статистики збільшення випадків таких захворювань, припустимо, що за календарний рік з проблемою дерматофітозів у м. Харкові виявляють 100 котів та 50 собак.

Для лікування тварин пропонується обрати препарат «Стоп лишай та грибок» (виробник О.Л.К.А.Р) (рис. 1.2). Даний лікарський засіб використовується у вигляді спрею. Препарат наносять на шкіру з розрахунку 0,2-0,3 мл на 1 кг маси тіла тварини. Курс лікування 1 раз на добу протягом 10-15 діб. У 100 мл препарату міститься 3 г діючої речовини – клотримазолу.

Для розрахунку приймаємо середню вагу kota 6 кг, а середня вага собаки становитиме 30 кг (оскільки залежно від породи собаки можуть досягати маси від 0,5 кг до 100 кг, тому для обрахунку приймаємо оптимальну вагу свійської собаки).

Узагальнені дані, щодо кількості препарату для лікування собак та котів наведено на рисунку 4.2.

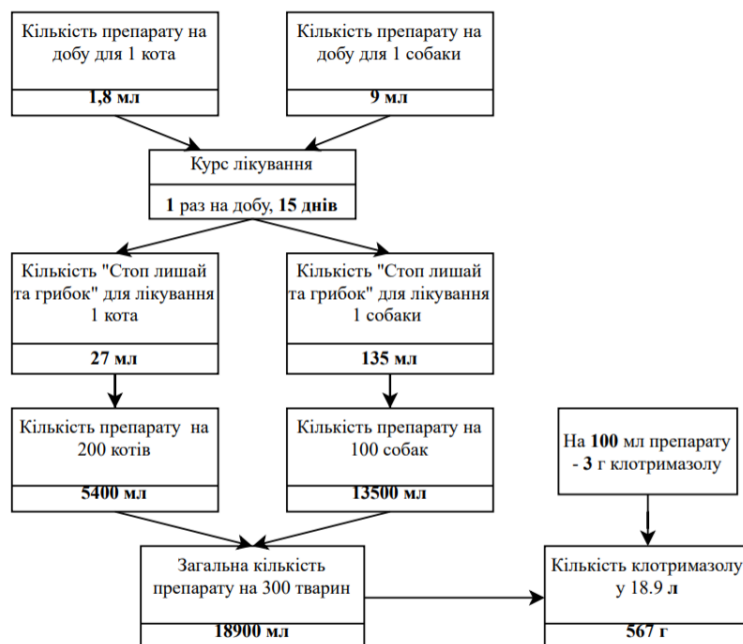


Рис. 4.2. Розрахунок потреби препарату

Примітка: середня маса кота 6 кг, собаки – 30 кг.

Отже, для 300 гол. тварин, загальна кількість розчину препарату становить 18,9 л. Так як у складі препарату «Стоп лишай та грибок» кількість діючої речовини клотримазолу становить 3 г на 100 мл, то сумарна кількість клотримазолу у 18,9 л становить 567 г.

Пропонуємо, половину розрахованої кількості антибіотику замінити на поверхнево-активні речовини *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Для перерахунку потрібно порівняти МІК антибіотика і ПАР, 4 мкг/мл для клотримазолу [78] і 58 мкг/мл для ПАР [74]. Отже, кількість поверхнево-активних речовин буде в 14,5 разів більшою, ніж антибіотика (МІК ПАР (58мкг/мл) /МІК клотримазолу (4 мкг/мл) = 14,5разів)

Враховуючи це, отримаємо загальну кількість ПАР необхідну для виготовлення препарату:

$$283,5 \times 14,5 = 4110,75 \text{ г}$$

4.3 Розрахунок потужності виробництва поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ-7241

Встановлено, що при культивуванні на відпрацьованій олії після картоплі фрі *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезує 3,9 г/л ПАР.

Рахуємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 3962 г ПАР:

$$V_{\text{кpo}} = \frac{4110,75 \text{ г}}{3,9 \text{ г/л}} = 1054 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (20%), необхідна кількість культуральної рідини складає:

$$V_{\text{кр}} = \frac{1054}{(1 - 0,2)} = 1318 \text{ л}$$

Прийmemo кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 17, тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}}/T_{\text{рд}} = \frac{1318}{17} = 77,5 \text{ л}$$

Інші 313 днів виробництво буде працювати для синтезу ПАР, що можуть використовуватися як ефективні антимікробні, антифунгальні агенти у інших цілях.

Тоді, розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{\text{крп}}$):

$$V_{\text{крп}} = K1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{пф}}/24 = 1,1 \times 84,6 \times 78/24 = 277 \text{ л}$$

де $T_{\text{пф}}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 72 год), $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Геометричний об'єм ферментера для отримання 303 л культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_r = \frac{V_{\text{крп}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{277}{0,6} = 461 \text{ л} \approx 500 \text{ л}$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

4.3.1 Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері

За виробничий цикл отримують $V_{\text{крп}} = 277$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{277}{1 - 0,1} \approx 307 \text{ л}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 307$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зан}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 307/0,6 = 511$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 500$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зан.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{307}{500} = 0,61$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{307}{1 + 0,1} = 279 \text{ л}$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 307 - 279 = 28 \text{ л}$$

4.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 50 л

Для одержання 30 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{28}{1 - 0,1} = 31 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 31/0,6 = 52 \text{ л}$.
 Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 50 \text{ л}$ та
 уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{31}{50} = 0,62$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{31}{1 + 0,1} = 28 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 31 - 28 = 3 \text{ л}$$

4.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 5 л

Для одержання 3 л посівного матеріалу кількість поживного середовища
та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням
втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря)
становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{3}{1 - 0,1} = 3,33 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 3,33/0,6 = 5,5 \text{ л}$.
 Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 5 \text{ л}$ та
 уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{3,3}{5} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{3,3}{1 + 0,1} = 3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 3,3 - 3 = 0,3 \text{ л}$$

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

Для одержання 0,3 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{300}{750 \times 0,2} = 2 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу бактеріального добрива у ферментері об'ємом 500 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 4 етапи:

- Вирощування культури в колбах на качалці.
- Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л.
- Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 50 л.
- Вирощування культури у ферментері об'ємом 500 л.

4.4 Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва

4.4.1 Обґрунтування вибору умов і способу культивування

Acinetobacter calcoaceticus ІМВ В-7241 є аеробним нейтрофілом, оптимальною температурою культивування є 30°C і рН близьке до нейтрального (6,8-7,0). Тому процес ферментації необхідно проводити в стерильних умовах з обов'язковою подачею стерильного повітря до ферментера. Такі фактори є сприятливими для розвитку багатьох мезофільних мікроорганізмів [76, 77], що вказують на необхідність стерилізації поживного середовища, обладнання, що використовується у біосинтезу та аераційного повітря.

Продуктом синтезу штаму ІМВ В-7241 є поверхнево-активні речовини, які є вторинними метаболітами. Тому доцільно буде використовувати глибинний метод, який допомагає отримати високу концентрацію ПАР,

оскільки при твердофазному культивуванні важче виділити позаклітинний метаболіт. Окрім цього найвища концентрація ПАР накопичується в культуральній рідині в стаціонарній фазі росту продуцента, тому біосинтез здійснюють методом періодичного культивування.

Так як субстрат використовують відпрацьовану олію після смаження картоплі фрі, вона виконуватиме роль піногасника. Окрім цього перевагою даного субстрату є відсутня необхідність його стерилізації.

Отже, даний біологічний агент необхідно культивувати періодичним, глибинним методом в стерильних умовах з постійною подачею стерильного аераційного повітря.

5.4.2 Обґрунтування вибору ферментера

Оскільки *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є облигатним аеробом необхідною умовою культивування є забезпеченням повітрям. Для цього найкраще використовувати ферментер, що оснащений барботером. Щоб забезпечити розчинення кисню в усьому об'ємі середовища та для інтенсифікації масообміну ферментер треба оснастити мішалкою. Оскільки в процесі біосинтезу не утворюється міцелій, не відбувається злипання біомаси, не накопичуються метаболіти, які підвищують в'язкість середовища, доцільно буде використовувати найдешевшу та найпростішу мішалку – лопатеву.

Для забезпечення контролю за рН середовища ферментатор повинен бути оснащений відповідним датчиком, що відображає значення рН. Ферментер повинен бути обладнаний чотирма відбивними перегородками для запобігання утворенню воронки при перемішуванні [78].

З замовленням щодо виробництва ферментера можна звернутися до фірми «BIORUS» [<https://bio-rus.ru>]. У ферментерах даного виробника передбачений контролер приводу мішалки, встановлення датчиків контролю рівня піни, тиску, рН, температури, механічна мішалка, контроль рівня рідини, система дозування середовища, двоканальна подача середовища, поточні виміри змісту метанолу і етанолу, заміри концентрації O₂ і CO₂ у відпрацьованих газах і т.д.



Рис. 4.3 Ферментер для культивування мікроорганізмів BLBЮ-500SJ

4.5. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Для синтезу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IBM-7241 необхідна аерація середовища, оскільки мікроорганізм росте в строго аеробних умовах. Тому одна з важливих стадій при культивування є підготовка стерильного аераційного повітря.

Під час роботи в боксах та лабораторіях з посівною культурою та інокулятором, використовують УФ-лампи для стерилізації повітря (опромінення ультрафіолетовими променями).

Забір атмосферного повітря здійснюється на висоті двох метрів над рівнем даху будівлі. Оскільки висота виробничої будівлі становить 8 м (6 м – висота стін, 0,5 м – фундамент, 1,5 м – дах), атмосферне повітря відбирається на висоті 10 м.

Для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування повітря стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки та індивідуальних фільтрів. Одним з основних поставлених вимог до фільтрувальних волокон є

висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра.

Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На головних фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [78].

5.6 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.

A. calcoaceticus IMB B-7241 вирощується на рідкому середовищі такого складу (г/л): відпрацьована олія після смаження картоплі фрі – 40; $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; дріжджовий автолізат – 0,25; розчин мікроелементів – 0,1% (об'ємна частка), зі складом (г/100мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; H_3BO_3 – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА – 0,5.

Відпрацьовану олію після смаження картоплі фрі (4% об'ємна частка) використовують як джерело вуглецю та енергії. Перевагою використання такого субстрату є відсутність потреби у стерилізації, оскільки субстрат застосовується у високій концентрації, що запобігає розвитку контамінації.

4.6.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Для отримання посівного матеріалу у колбах на качалці потрібно 0,3 л, тому стерилізація компонентів буде відбуватися в автоклаві. Середовища розбивають на такі композиції:

Композиція А: Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

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

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

нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Стерилізацію композицій А і Б здійснюють в автоклаві.

Дріжджовий автолізат є термолабільним потребує м'якого режиму стерилізації. Його готують окремо як запасний розчин та стерилізують у автоклаві при 112°C протягом 30 хв.

Окремо готують допоміжний розчин мікроелементів об'ємом 100 мл (з розрахунку на використання в трьох стадіях підготовки посівного матеріалу) і стерилізують в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв.

4.6.2 Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л

На другому етапі необхідно одержати 3,3 л поживного середовища. Для цього використовують інокулятор об'ємом 5 л.

Оскільки для даної стадії отримання посівного матеріалу потрібно 3,3 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні до підпункту 4.6.1.

4.6.3 Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л

Оскільки об'єм поживного середовища становить 28 л, його стерилізацію проводять безпосередньо у посівному апараті. Це вимагає перескладання композицій:

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

Композиція Б: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NaCl , $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 (режим стерилізації: 131 °С, 40хв, рН 4,0 – 4,5).

Для зменшення витрат і спрощення технології, приготування поживного середовища на даному етапі фосфорні і основні солі (композиція Б) готують в збірнику на 50 л і стерилізують в інокуляторі об'ємом 50 л при 131°C і 1,5 атм впродовж 40 хв.

Так як при стерилізації основних та фосфорних солей утворюється осад фосфатів магнію та кальцію, необхідно забезпечити кисле (4,0-4,5) рН середовища, при якому солі не випадають в осад. Підкислення поживного

середовища здійснюють за допомогою 6% розчину HCl у розрахунку 2 мл на 1 л середовища. Тому для 28 л поживного середовища необхідно 56 мл розчину хлоридної кислоти, яка не потребує попередньої стерилізації, розчин готуємо в лабораторних умовах у колбі на 250 мл.

Після закінчення стерилізації та охолодження середовища, стабілізують значення рН до 6,8-7, 6 %-м розчином стерильного гідроксиду натрію у кількості 56 мл. Розчин готують і колбі на 250 мл та стерилізують в автоклаві при 131°C, впродовж 40 хв.

4.6.4 Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

На даному етапі необхідно підготувати 307 л поживного середовища. Середовище ділять на такі композиції:

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

Композиція Б: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NaCl, $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, ЕДТА (режим стерилізації: 131 °С, 40хв).

Приготування *композиції А і Б* буде відбуватися у збірнику, а стерилізація – у ферментері (131 °С і 1,5 атм впродовж 40 хв).

Оскільки при стерилізації основних та фосфорних солей утворюється осад фосфатів магнію та кальцію, необхідно забезпечити кисле (4,0-4,5) рН середовища, при якому солі не випадають в осад. Підкислення поживного середовища здійснюють за допомогою 6% розчину HCl у розрахунку 2 мл на 1 л середовища. Тому для 307 л поживного середовища необхідно 614 мл розчину хлоридної кислоти, яка не потребує попередньої стерилізації, розчин готуємо в колбі об'ємом 1 л.

Так як об'єм поживного середовища на даній стадії становить 307 л, розчин мікроелементів можна зважити на технічних вагах і стерилізувати разом з солями, що виключає стадію приготування запасного розчину.

Дріжджовий автолізат вносять в кількості 0,25 г/л, тому для 307 л поживного середовища необхідно 77 г автолізату. Його готують у збірнику на 5 л та стерилізують при 112 °С, впродовж 30 хв.

4 % (об'ємна частка) відпрацьованої олії (12,3 л) подають з окремого збірника.

Після закінчення стерилізації та охолодження середовища, стабілізують значення рН до 7, 6 %-м розчином стерильного гідроксиду натрію у кількості 614 мл (стерилізують в колбі об'ємом 2 л при 131 °С, впродовж 40 хв).

4.7 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Для регуляції рівня рН середовища під час вирощування мікроорганізмів, використовують 6%-ві розчини соляної кислоти та їдкого натрію.

Щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію рН середовища при вирощуванні в інокуляторі та на виробничому біосинтезі, перед стерилізацією підкислюють до значення 4,5 6% розчином соляної кислоти. Даний розчин стерилізації не потребує.

Перед культивуванням рН середовища, що використовується для вирощування в інокуляторі та виробничому біосинтезі, підлужують до 6,8-7,0 за допомогою стерильного 6% розчину їдкого натрію, який стерилізують в автоклаві при 131°С (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає **такі додаткові стадії:**

1. Підготовка 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища при стерилізації його в посівному апараті об'ємом 50 л та ферментері об'ємом 500 л;

2. Підготовка стерильного 6% розчину їдкого натрію для підлуження середовища після стерилізації у посівному апараті на 50 л і ферментері на 500 л.

3. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів (100 мл) в колбі на 250 мл для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, посівних апаратах на 5 та 50 л.

4. Приготування та стерилізація розчину дріжджового автолізу (150 мл) в колбі на 250 мл для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках та посівному апараті на 5 л.

5. Приготування та стерилізація розчину дріжджового автолізу для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 500 л в реакторі на 5 л.

6. Підготовка збірників:

- збірник для розчинення компонентів композиції при стерилізації середовища для культивування в посівному апараті об'ємом 50 л;
- збірник для розчинення компонентів при стерилізації середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 400 л;
- збірник з сорочкою об'ємом 25 л для рафінованої олії для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 500 л.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм ПС, л	Олія		Дріжджовий автолізат		HCl (6%)		NaOH	
	Об'єм, мл	Ємність для внесення	Вміст, г	Особливість приготуван ня	Об'єм, мл	Особливість приготуван ня	Об'єм, мл	Особливіст ь приготува ння
0,3	12	піпетка	0,075	Запасний розчин	-	-	-	-
3,3	132	колба на 250 мл	0,825	(у колбі на 250 мл)	-	-	-	-
28	1,12 л	колба на 2 л	7	У колбі на 750 мл	56	У колбі на 250 мл	56	У колбі на 250 мл
307	12,3 л	збірник на 16 л	76,25	У збірнику на 5 л	614	У колбі на 1л	614	У колбі на 1 л

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	ZnSO₄×7H₂O	MnSO₄·H₂O	FeSO₄×7H₂O	CuSO₄×5H₂O	CoSO₄×7H₂O	H₃BO₃	КІ	ЕДТА
0,3	3,3 мг	1,8 мг	0,3 мг	12 мкг	0,09 мг	18 мкг	0,3 мкг	1,5 мг
3,3	36,3 мг	19,3 мг	3,3 мг	0,132 мг	0,99 мг	0,198 мг	3,3 мкг	16,5 мг
28	308 мг	168 мг	28 мг	1,12 мг	8,4 мг	1,7 мг	28 мкг	140 мг
307	3,8 г	1,85 г	0,307 г	0,0123 г	0,092 г	0,0185 г	0,0003 г	1,53 г

5.8 Специфікація обладнання

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі наведена у табл. 4.4. Детальну характеристику апаратів наведено у Додатку 1.

Таблиця 4.4

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу поверхнево-активних речовин

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник А1И 019.000-01 Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». Повітрозабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень [79]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G3. Фільтруючий матеріал – скловолокно, Площа фільтруючої поверхні 18 м ² , продуктивність 3400 м ³ /год Виробник: «ВЕНТ-ФИЛЬТР» [80]
К-3	Компресор	1	Компресор серії DVK D з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» [81]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач, температурний діапазон від -30

			до +200 ° С, максимальний робочий тиск 2,5 Мпа Виробник: «Анкор-Теплоенерго» [82]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Р 180.370. Об'єм 270 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: "Конгур" [83]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач водяний AeroStar SWH 50-30. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, робоча температура 130 ° С. Виробник: «AeroStar» [84]
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Ламельний фільтр Infastaub. Максимальна робоча температура: 110 °С. Ступінь очищення становить 0,001 мг/м ³ [85]
Ф-8	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтр повітряний Ultradepth II P-SRF. Фільтруючий матеріал - боросилікат, розмір фільтру – 7,6×1,27 см, діапазон температур від -4 до 400 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9 % [86]
І-9	Інокулятор	1	Інокулятор ВЛВІО-5 об'ємом 5 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою

			перетискування, пробовідбірником, механічною мішалкою, сталь 316L. Габарити 890×660×1600. Виробник: «КНИК ХИМ» [87]
P-10	Реактор- змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (24-30 об/хв), нержавіюча сталь. Габарити: 650×650×1100 см. Виробник: "Технолог" [88].
H-11	Насос	1	Насос реверсивний, матеріал корпусу – бронза, ВЕ-М 10 продуктивність до 210 л/год, Виробник: "Насосы Ампики" [89].
Ф-12	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Фільтр повітряний Ultradepth II P-SRF. Фільтруючий матеріал - боросилікат, розмір фільтру – 10,16×1,27 см, діапазон температур від -4 до 400 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9 % [86]
I-13	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 50 л, оснащений сорочкою, барботером, з механічною або магнітною мішалкою, нержавіюча сталь марки 316L.

			Габарити: 1300×790×1700. Виробник: «BIORUS®» [90]
P-14	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 400 л, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (50 об/хв), нержавіюча сталь. Габарити: 800×2535×1210 см. Виробник: "ЕВРОХИММАШ" [91].
H-15	Насос	1	Насос реверсивний, матеріал корпусу – бронза, продуктивність ВЕ-М 14 продуктивність до 1398 л/год. Виробник: "Насосы Ампики" [89].
P-16	Збірник для відпрацьованої олії	1	Збірник СЕнв об'ємом 25 л, сталевий, без сорочки. Виробник: "ЕВРОХИММАШ" [92]
P-21	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації дріжджового автолізу	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (25-55 об/хв), робочий тиск 1 Бар, турбінна та якірна мішалка. Габарити: 550×660×940 мм. Виробник: "Промвित" [93].

Ф-18	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Фільтр повітряний Ultradepth II P-SRF. Фільтруючий матеріал - боросилікат, розмір фільтру – 10,16×1,4 см, діапазон температур від -4 до 400 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9 % [86]
ФР-19	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 500 л, оснащений сорочкою, барботером, з механічною мішалкою (200-400 об/хв), нержавіюча сталь марки 316L. Габарити: 2000×1500×2800. Виробник: «BIORUS®» [94]

4.9 Опис технологічної схеми процесу біосинтезу цільового продукту

Технологічна схема біосинтезу поверхнево-активних речовин включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування розчинів титрувальних агентів, підготовка і стерилізація поживних середовищ, запасних розчинів дріжджового автолізу та мікроелементів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241).

Технологічну і апаратурну схему біосинтезу ПАР наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник (ПЗ-1) на висоті 10 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення 85%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються, знижується кількість контамінантів.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною 0,5 Мпа, температура повітря підвищується 200-250 о С. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 18,2 °С у теплообмінному апараті (Т-4), далі видалену вологу подають на ресивер (Р-5), у якому відбувається видалення зайвої вологи до $W = 60 \%$.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охоложене повітря у теплообміннику (Т-6) нагрівають до температури 30 °С.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через фільтр тонкої очистки (Ф-7), в якому фільтрувальним матеріалом є скловолокно. Ступінь очищення становить $E = 95\%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр Ф-8, Ф-12, Ф-18), в якому фільтруючим матеріалом є боросилікатне волокно. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 50 л

Для приготування 56 мл 6%-ї хлоридної кислоти, в колбу об'ємом 250 мл вносять 47 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 9 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 2.1.2. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 500 л

Для приготування 614 мл 6%-ї хлоридної кислоти, в колбу об'ємом 1 л вносять 512 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 102 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 50 л

Для приготування 56 мл розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на технічних вагах зважують 3,4 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 250 мл і додають 52 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 500 л

Для приготування 614 мл розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на технічних вагах зважують 37 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 1 л і додають 577 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація запасних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

На технічних вагах зважують 1,1 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,6 г $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,1 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,004 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,03 г $CoSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,006 г H_3BO_3 ; 0,0001 г KI та 0,5 г ЕДТА. Наважки вносять в колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують 40 хв при 131°C.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчину дріжджового автолізату

На технічних вагах зважують 5 г дріжджового автолізату, наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, та додають 100 мл дистильованої води. Перемішують для кращого розчинення. Стерилізують в автоклаві при 112°C (0,05 МПа) 30 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

Для вирощування інокуляту необхідно 300 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в *табл. 5.5*.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 300 мл
середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 300 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
(NH ₄) ₂ CO	0,35	0,105	Б	150
NaCl	0,1	0,03		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,03		
Вода	-	150 мл		
КН ₂ РО ₄	0,14	0,042	В	138
Na ₂ НРО ₄	0,6	0,18		
Вода	-	138 мл		
Відпрацьована олія	40 мл	12 мл		12
				Всього 300 мл

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,105 г (NH₄)₂CO і 0,03 г NaCl, 0,03 г MgSO₄·7H₂O. Наважки поміщають у колбу 250 мл, додають 150 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,042 г КН₂РО₄ та 0,18 г Na₂НРО₄. Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 138 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 5 л

Для вирощування інокуляту необхідно 3 л поживного середовища. Для засіву інокулятора (І-9) використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого 300 мл, тому загальна кількість води для приготування поживного середовища становитиме 2,7 л.

Вміст компонентів для приготування 3 л середовища наведено в *табл. 5.6.*

Таблиця 4.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 3 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
(NH ₄) ₂ CO	0,35	1,05	А	1,3
NaCl	0,1	0,3		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,3		
Вода	-	1,3 л		
КН ₂ РО ₄	0,6	1,8	Б	1,3
Na ₂ НРО ₄	0,14	0,42		
Вода	-	1,3 л		
Відпрацьована олія	40 мл	120 мл		0,12
Всього				2,72 л

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,05 г (NH₄)₂CO і 0,3 г NaCl, 0,3 г MgSO₄·7H₂O. Наважки поміщають у колбу 3 л, додають 1,3 л дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,42 г КН₂РО₄ та 1,8 г Na₂НРО₄. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1,3 л дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л

Для вирощування інокуляту необхідно 28 л поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого 3 л, конденсату, що утворюється в процесі стерилізації (10% від об'єму середовища), та відпрацьованої олії (1,12 л), то загальна кількість води, яку необхідно додати

для приготування середовища – 24 л. Вміст компонентів для приготування 28 л середовища наведено в *табл. 4.7*.

Таблиця 4.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 28 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 30 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
дріжджовий автолізат	0,25	7	А	0,15
Вода	-	150 мл		
(NH ₄) ₂ CO	0,35	9,8	Б	24
NaCl	0,1	2,8		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	2,8		
KH ₂ PO ₄	0,6	16,8		
Na ₂ HPO ₄	0,14	3,9		
Вода	-	24 (л)		
Конденсат	-	2,8		
Олія	40 мл	1,12 мл	-	1,12
				Всього 28 л

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 7 г дріжджового автолізату. Наважку вносять в колбу об'ємом 750 мл, додають 150 мл дистильованої води, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112⁰С упродовж 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 9,8 г (NH₄)₂CO і 2,8 г NaCl, 2,8 г MgSO₄·7H₂O, 16,2 г KH₂PO₄, 3,9 г Na₂HPO₄. Наважки поміщають у збірник (Р-10), обладнаний сорочкою, на 50 л і за допомогою лічильника додають 24 л води.

Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають глуху пару і нагрівають розчин солей до 40⁰С при перемішуванні 50-100 об/хв. Розчин

солей перекачують насосом (Н-11) у інокулятор (І-13) об'ємом 50 л для подальшої стерилізації. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію рН розчину з солями, перед стерилізацією доводять до значення 4,5 б %-вим розчином соляної кислоти (56 мл, від ДР 2.1.1), який подають через засівну колбу.

Стерилізація поживного середовища проходить в інокуляторі (І-13) за тиску 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 1 год.

Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування у ферментері об'ємом 500 л

Для виробничого біосинтезу у ферментері (Ф-19) об'ємом 500 л, потрібно приготувати 277 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 277 л середовища наведено у *табл. 5.8.*

Для засіву даного ферментера потрібно внести 28 л рідкого посівного матеріалу і 11,2 л відпрацьованої олії як субстрату, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація поживного середовища проходить безпосередньо у ферментері. Тоді об'єм води, потрібний для приготування поживного середовища, становить 228 л.

Таблиця 4.8

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 277 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 300 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
дріжджовий автолізат	0,25	70	А	1,5
Вода	-	1,5		
(NH ₄) ₂ CO	0,35	97	Б	236,5
NaCl	0,1	27,7		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	27,7		
KH ₂ PO ₄	0,6	166		

Na ₂ HPO ₄	0,14	39		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,011	3		
MnSO ₄ · H ₂ O	0,006	1,6		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001	0,27		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,00004	0,011		
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,0003	0,08		
H ₃ BO ₃	0,00006	0,016		
KI	0,000001	0,0002		
ЕДТА	0,005	1,4		
Вода	-	208 л		
Конденсат	-	28		28
Олія	40 мл	11,2 л	-	11,2 л
				Всього 277 л

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 70 г дріжджового автолізату, поміщають у збірник (Р-21) об'ємом 5 л і через засівну колбу додають 1,5 л води і перемішують до розчинення. Розчин дріжджового автолізату стерилізують в збірнику при 112°C (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 97 г (NH₄)₂CO і 27,7 г NaCl, 27,7 г MgSO₄×7H₂O, 166 г KH₂PO₄, 39 г Na₂HPO₄, 3 г ZnSO₄ · 7H₂O, 1,6 г MnSO₄ · H₂O, 0,27 г FeSO₄ · 7H₂O, 0,011 г CuSO₄ · 5H₂O, 0,08 г CoSO₄ · 7H₂O, 0,016 г H₃BO₃, 0,0002 г KI та 1,4 г ЕДТА та поміщають у збірник (Р-14). Далі при постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають через лічильник 236,5 л питної води. Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають пару до досягнення температури в збірнику на рівні 40°C. Після розчинення солі композиції Б подаються за допомогою насоса (Н-15) в ферментер (Ф-19) об'ємом 500 л, де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від ДР 2.1.2) до рН 4,0 – 4,5 за допомогою мірної колби. Стерилізують композицію подачею гострої пари 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *A. calcoaceticus* IMB В-7241 зберігають у пробірках зі скошеним зі скошеним м'ясо-пептонним агаром. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Щоб отримати робочу культуру, необхідно колекційну культуру, що зберігається в пробірках з скошеним поживним середовищем, необхідно розсіяти петлею на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром до ізольованих колоній, вирощуючи бактерії при температурі 30⁰С упродовж 24 год.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії з чашок Петрі пересівають петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром, причому одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки. Використовуються колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість вирощування – 24 год при 30⁰С.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 500 мл із 150 мл розчину стерильної композиції А (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах вносять 138 мл розчину стерильної композиції Б (від ДР 4.1.2), та за допомогою піпетки 0,2 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1), 1 мл дріжджового автолізу (від ДР 3.2). Перемішують і розливають по 150 мл у дві стерильні колби об'ємом 750 мл та у кожну колбу за допомогою піпетки додають по 6 мл відпрацьованої олії.

У пробірку з робочою культурою *A. calcoaceticus* IMB В-7241, вирощену на агарі, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колбу. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву

однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Вирощують культуру при 220 об/хв. упродовж 24 год при 30⁰С.

По закінченню процесу проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини кожної колби, а також визначають концентрацію біомаси. Для посівного матеріалу на 24 годину культивування повинна становити 0,5 - 0,6 г/л.

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

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л

Для вирощування інокуляту у стерильну засівну колбу об'ємом 5 л в асептичних умовах вносять 1,3 л розчину стерильної композиції А (від ДР 4.2.1), 1,3 л розчину стерильної композиції Б (від ДР 4.2.2), та додають за допомогою піпетки 3 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1) та 15 мл дріжджового автолізату (від ДР 3.2), 120 мл відпрацьованої олії та перемішують. Отримане поживне середовище вносять у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 5 л (ІН-10) та додають посівний матеріал (через засівну колбу від ТП 5.4).

Тривалість культивування складає 24 год при 30⁰С. Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, яка для посівного матеріалу на 24 годину культивування повинна становити 0,6 - 1 г/л.

ТП 5.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 50 л

У посівний апарат (І-13) зі стерильною композицією Б (від ДР 4.3.2), вносять, через засівну колбу об'ємом 1 л, 0,15 л стерильної композиції А (від ДР 4.3.1) в яку попередньо додають 28 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1).

1,2 л відпрацьованої олії вносять в інокулятор (І-13) через окрему засівну колбу. Після цього рН доводять за допомогою стерильного 6%-го розчину їдкого натрію (від ДР 2.2.1) до рН 7,0.

Далі в посівний апарат подають інокулят (через трубу перетискування від *ТП 5.5* (ІН-10)). Включають перемішуючий пристрій, аерацію, в сорочку інокулятора подають пару. Тривалість культивування складає 24 год при 30°C.

Кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, яка для посівного матеріалу на 24 годину культивування повинна становити 1-1,6 г/л.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування в ферментері розміром 500 л

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 500 л (ФР-19). В ферментер, з композицією Б (від *ДР 4.4.2*), зі збірника об'ємом 5 л (Р-17) самоплином подають композицію А (від *ДР 4.4.1*) та із збірника об'ємом 25 л (Р-16) подають 11,2 л відпрацьованої олії. Для нейтралізації рН середовища до значення 7,0 в посівний апарат подають 6%-вий розчин NaOH (від *ДР 2.2.2*), після чого вносять через трубу перетискування посівний матеріал (І-13) (від *ТП 5.6*).

У сорочку ферментера подається пара, вмикається перемішуючий пристрій і аерація. Тривалість культивування складає 120 год при 30°C за постійної аерації.

Кожні 4 години з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, що має становити 1,8 г/л. У пробі, відібраній на 72 год культивування, визначають концентрації ПАР ($C = 3,9$ г/л).

4.10 Контроль виробництва поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus*

ІМВ В-7241

Упродовж культивування кожні 4 год відбирають проби культуральної рідини (окрім підготовки посівного матеріалу в колбах на качалках, де проба відбирається лиш після культивування) для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю (олія) і азоту (сечовина).

4.10.1 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо– картопляним агаром (ГКА) або сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів [95].

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після роботи ватюю, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива. За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

4.10.2. Визначення концентрації біомаси.

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [95]. Перед визначенням потрібно спочатку видалити залишкову олію.

У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм). Концентрацію біомаси визначають за калібрувальним графіком.

4.10.3. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин.

Концентрацію ПАР в супернатанті визначають ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча.

Для отримання супернатанту клітини відділяють від культуральної рідини центрифугуванням при 5000 обертів 45 хвилин. Для видалення залишків олії супернатант попередньо екстрагують петролейним ефіром (1:1).

Екстракцію проводять наступним чином: для екстракції ПАР у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл вносять 25 мл супернатанту і 25 мл суміші Фолча (хлороформ і метанол в співвідношенні 2:1), воронку закривають пришліфованою пробкою і струшують (для екстракції ліпідів) упродовж 5 хв.

Отриману після екстракції суміш залишають в воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирають (органічний екстракт 1), а водну фазу піддають повторній екстракції, як описано вище. Після розділення фаз зливають нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додають 50 мл суміші Фолча, здійснюють екстракцію, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують і упарюють на роторній випарній установці при температурі 50°C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси [96].

4.10.4. Визначення концентрації джерела Карбону і Нітрогену

Визначення відпрацьованої соняшникової олії.

Для визначення концентрації вуглецю в культуральній рідині відділяли клітини центрифугуванням (5000 g) протягом 45 хв і проводили екстракцію олії n-гексадеканом до відділення біомаси.

Органічна фаза випаровувалася під вакуумом у роторному випарному апараті до сухого залишку постійної маси при 70°C і зважувалася [96].

Визначення концентрації сечовини.

Вміст сечовини визначали методом вискоефективної тонкошарової хроматографії з детектором флуоресценції як описано у роботі [97], з посиланням на працю [98].

Підготовка проби до аналізу: культуральну рідину центрифугують (5000 g) протягом 45 хв, супернатант використовують для аналізу

Для проведення аналізу використовували 10 мкл зразка, який наносили на пластину за допомогою TLC-аплікатора AS 30 Desaga (Гейдельберг, Німеччина) смугою у 5 мм (висота від краю пластинки 12 мм). Та залишали при кімнатній температурі в неосвітленому скляному посуді, що містив абсолютний етанол та 13,5М аміаку (99:1). Рухома фаза піднімалася на відстань 80 мм. Після випаровування розчинника пластину обприскували розчином що містить 0,5% (масова частка.) р-диметиламінобензальдегіду і 0,5% (об'ємна частка) сірчаної кислоти в абсолютному етанолі за допомогою розпилювача SG1 (Desaga, Німеччина). Після витримки протягом 10 хв, площа піків кожної плями вимірювали денситометрією. Для визначення концентрації невідомих зразків, використовували три різні стандартні концентрації (10, 20 та 50 мг/мл). Кількісне визначення тонкошарових хроматограм проводили за допомогою Денситометра Desaga CD60 (Гейдельберг, Німеччина), що здійснював лінійне сканування в режимі ремісії-екстинції при 418 нм.

Умови аналізу: ширина смуги 0,2 мм; довжина смуги 2 мм; ширина розмаху 0,5 мм. Концентрації вимірювали шляхом обчислення площ піків стандартів та зразка.

4.10.5. Карта постадіного контролю

Карту постадійного контролю виробництва поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.9

Карта контрольних точок виробництва ПАР

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
---	--	---------------------------	---	-------------------------------

1	2	3	4	5
ДР 1. Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.2. <i>Грубе очищення повітря</i>	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %
Кт 1.3 <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,5 МПа t = 200-250 °C
Кт 1.4 <i>Охолодження повітря та видалення зайвої вологи</i>	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 18-19 °C, W = 60 %
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 40-50 °C
Кт 1.6. <i>Очищення повітря в тонкому фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95 %,
Кт 1.7. <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,999 %
ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів				
Кх, 2.1. <i>Приготування 6% розчину HCl</i>	Розчин HCl концентрація	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C=6%
Кт, Кх, Км, 2.2	Розчин NaOH,	Хімічний метод, манометр	Концентрація визначається після	C=6% P = 0,15 МПа,

<i>Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH</i>	концентрація, тиск, час, стерильність	технічний, годинник, мікробіологічний контроль	приготування розчину, тиск – під час стерилізації. Мікробіологічний контроль здійснюється після стерилізації.	t = 131 °C, τ = 40 хв відсутність мікробіоти
ДР 3. Приготування і стерилізація запасних розчинів				
Кт, Км, 3.1. <i>Приготування та стерилізація розчину мікроелементів</i>	Розчин мікроелементів Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131°C τ = 40 хв відсутність мікробіоти
Кт, Км, 3.2. <i>Приготування та стерилізація розчину дріжджового автолізу</i>	Розчин дріжджового автолізу Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 112°C τ = 30 хв відсутність мікробіоти
ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ				
Кт, Км, 4.1.1, 4.2.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для інокуляту в колбах на качалках та інокулятора об'ємом 5 л</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131°C τ = 40 хв відсутність мікробіоти
Кт, Км, 4.1.2, 4.2.2 <i>Приготування та</i>	Композиція Б Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник,	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний	P = 0,15 МПа t = 131°C

<i>стерилізація композиції Б</i>		мікробіологічний контроль	контроль після стерилізації	$\tau = 40$ хв відсутність мікробіоти
Кт, Км, 4.3.1, 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту в інокуляторі об'ємом 50 л та біосинтезу у ферментері 500 л</i>	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа $t = 112^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30$ хв відсутність мікробіоти
Кт, Км, 4.3.2, 4.4.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа $t = 131^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40$ хв відсутність мікробіоти
ТП 5. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 5.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 температура, мікробіологічна чистота культури	Датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирошування культури в термостаті та зберіганні в холодильнику, мікробіологічний контроль кожні 3-4 місяці	$t = 4^{\circ}\text{C}$ (в холодильнику), $t = 30^{\circ}\text{C}$ (в термостаті) відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Робоча культура <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241, тривалість вирошування, температура,	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирошування культури в термостаті,	$\tau = 48$ год $t = 30^{\circ}\text{C}$, відсутність сторонньої мікробіоти

	мікробіологічна чистота культури		мікробіологічний контроль після вирощування.	
Кт, Км, 5.3 <i>Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Робоча культура A. calcoaceticus IMB В-7241, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування культури в термостаті, мікробіологічний після вирощування	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 5.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, частота обертів качалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	ФЕК, годинник, термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюються під час культивування, мікробіологічний контроль та концентрація біомаси після культивування	t = 30 °С, τ = 24 год, n = 320 об/хв, X=0,5-0,6 г/л відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 5.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л</i>	Посівний матеріал, тривалість культивування, рН, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси, витрати повітря	ФЕК, датчик рН та температури, тахометр, ротаметр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікробіологічний проводять кожні 4 години та визначають біомасу	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 300 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти x = 0,5-0,6 г/л
Кт, Км, 4.6 <i>Вирощування культури в</i>	Посівний матеріал,	ФЕК, датчик рН та	Витрата повітря, рН,	t = 30 °С, τ = 24 год,

<i>інокуляторі об'ємом 50 л</i>	тривалість культивування, рН, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси, витрати повітря	температури, тахометр, ротаметр, годинник, мікробіологічний контроль	температура, швидкість обертів вимірюються та підтримуються автоматично під час культивування, мікробіологічний контроль та концентрація біомаси проводять кожні 4 години	w = 300 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти x = 0,5-0,6 г/л
-------------------------------------	---	---	--	--

ТІ 6. Виробничий біосинтез

Кт, Кх, Км 6.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 500 л</i>	Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН концентрація біомаси та ПАР, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, технічний тахометр, мікроскоп, концентрація біомаси та ПАР	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування, мікробіологічний контроль проводять кожні 4 години та визначають біомасу, і концентрацію ПАР	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 300 об/хв, рН = 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти с = 4 г/л х = 3,9 г/л
---	---	---	---	---

РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЧОЇ ФЕРМЕНТАЦІЇ В ПРОЦЕСІ ВИРОБНИЦТВА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Автоматизація виробництва — застосування технічних засобів, економіко-математичних методів і систем керування, що вивільняють людину від функцій управління й залишають за людиною функції контролю та прийняття рішень. Автоматизація сприяє загальному технологічному прогресу суспільства й полягає у створенні можливостей для поліпшення умов і продуктивності праці, зростання якості продукції і, як результат, — підвищенню конкурентоспроможності продукції на ринку. Розрізняють автоматизацію часткову, комплексну і повну [99].

Часткова — автоматизація окремих виробництв, операцій, здійснюється в тих випадках, коли управління процесами внаслідок їх складності або швидкості практично недоступні людині, а прості автоматичні пристрої ефективно замінюють її. Частково автоматизується, як правило, діюче виробництво і устаткування. З удосконаленням засобів автоматизації та розширенням сфери їх застосування встановлено, що часткова автоматизація найбільш ефективна тоді, коли виробництво, устаткування розробляють одразу як автоматизоване [100]. До часткової автоматизації належить також автоматизація адміністративних робіт. При комплексній автоматизації окрема виробнича ділянка: ділянка, цех, завод — функціонують як єдиний автоматизований комплекс при загальному контролі з боку людини. Комплексна автоматизація охоплює всі основні виробничі функції підприємства, господарства, служби. Вона доцільна лише при високорозвиненому виробництві на базі досконалої технології та прогресивних методів управління із застосуванням надійного виробничого устаткування, діючого за заданою програмою.

					НУХТ БТЕК 04.02.32 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Бахтій О.П.			РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЧОЇ ФЕРМЕНТАЦІЇ В ПРОЦЕСІ ВИРОБНИЦТВА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		Пирог Т.П.					83	4212
<i>Реценз.</i>		Сухоребра Л.М.				85		
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						

Повна автоматизація — вищий рівень автоматизації, що передбачає передачу всіх функцій управління автоматичним і автоматизованим системам. Повна автоматизація можлива тільки при використанні міні- та мікро-ЕОМ або мікропроцесорної техніки. Це можуть бути гнучкі виробничі системи або роботизовані комплекси [100].

За останні роки відбулися значні зміни в масштабах та рівні автоматизації технологічних процесів біотехнологічних виробництв — харчових та фармацевтичних. Застосовуються більш нові вимірювальні технічні засоби та системи управління на електронній основі. Також були впроваджені автоматизовані технологічні комплекси на основі використання мікропроцесорної техніки. Початковий ступінь автоматизації виробництва супроводжується застосуванням окремих машин-автоматів та напівавтоматів. Використання автоматизованих систем машин на виробництві повинно органічно поєднуватися з автоматизованою системою управління. Розвинуті країни Заходу пройшли в основному початковий етап автоматизації виробництва й обігу і переходять до найвищого ступеня автоматизації. Пострадянські держави перебувають лише на початковому етапі цього процесу. Технологічний спосіб виробництва базується у них здебільшого не на автоматизованій, а на машинній та ручній праці. Без сучасної інформаційної технології матеріальне виробництво стає все більш неконкурентоспроможним, а країна приречена на технологічне, економічне, політичне, культурне відставання і може перетворитися на економіко-інформаційну колонію розвинутих країн світу [101].

Використання сучасних засобів і систем автоматизації дозволяє вирішувати наступні задачі: автоматично враховувати безперервні зміни технологічних параметрів; постійно враховувати динаміку виробничого плану для відповідності номенклатурі випущеної продукції шляхом оперативного пере налаштування режимів технологічного обладнання; автоматично керувати технологічними процесами в умовах шкідливих або небезпечних для людини факторів, яких багато на виробництвах.

6.1. Опис апаратурно-технологічної схеми автоматизації

Acinetobacter calcoaceticus IMB В-7241 є аеробним нейтрофілом, оптимальною температурою культивування є 30°C і рН близьке до нейтрального (6,8-7,0). Тому процес ферментації необхідно проводити в стерильних умовах з обов'язковою подачею стерильного повітря до ферментера. Такі фактори є сприятливими для розвитку багатьох мезофільних мікроорганізмів [102, 103], що вказують на необхідність стерилізації поживного середовища, обладнання, що використовується у біосинтезу та аераційного повітря. Продуктом синтезу штаму IMB В-7241 є поверхнево-активні речовини, які є вторинними метаболітами. Тому доцільно буде використовувати глибинний метод, який допомагає отримати високу концентрацію ПАР, оскільки при твердофазному культивуванні важче виділити позаклітинний метаболіт. Окрім цього найвища концентрація ПАР накопичується в культуральній рідині в стаціонарній фазі росту продуцента, тому біосинтез здійснюють методом періодичного культивування.

Так як субстрат використовують відпрацьовану олію після смаження картоплі фрі, вона виконуватиме роль піногасника. Окрім цього перевагою даного субстрату є відсутня необхідність його стерилізації.

Отже, даний біологічний агент необхідно культивувати періодичним, глибинним методом в стерильних умовах з постійною подачею стерильного аераційного повітря.

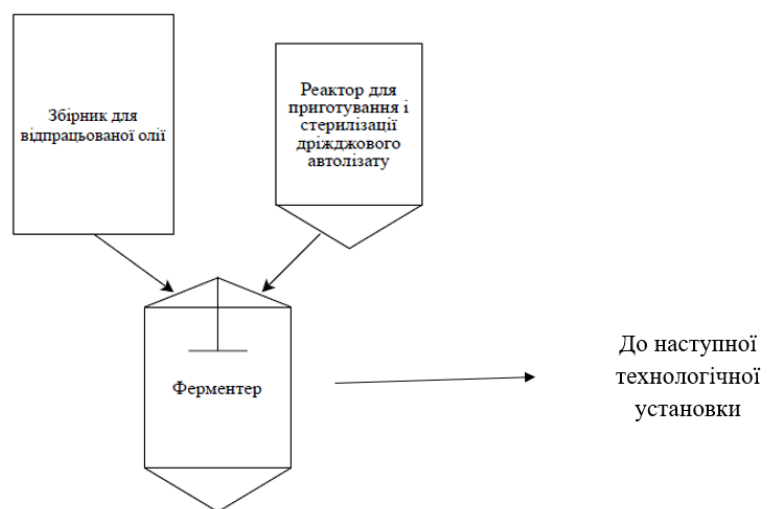


Рис. 5.1. Машинно-апаратурна схема ділянки біосинтезу

5.2. Завдання на розробку схеми автоматизації

Таблиця 5.1

№	Машина,агрегат, установка	Параметр	Значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю та управління	Засіб управління та контролю, реалізації
1	Збірник для відпрацьованої олії	Рівень рідини в апараті	80% ± 3%	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
2	Реактор для приготування і стерилізації дріжджового автолізу	Рівень рідини в апараті	70% ± 3%	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
		Температура середовища	112°C±2°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
		Час стерилізації	30 хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
5	Виробничий ферментер	Рівень рідини в апараті	60% ± 3%	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора

	Час культивування	120 год	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
	Температура середовища	30°C±2°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Концентрація розчиненого кисню	0,015м ³ /м ³ *хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Інтенсивність перемішування	150 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
			Управління	Пуск/стоп, зміна частоти	Частотний перетворювач
	Надлишковий тиск в апараті	0,5 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

5.3. Опис функціональної схеми автоматизації

Так у відповідності з завданням, сформованим у *табл. 5.1* опишемо схему автоматизації.

У *першому контурі* автоматичного контролю, в збірнику для відпрацьованої олії необхідно контролювати рівень рідини, який має становити 80% . Олія, що поступає в збірник контролюється за допомогою датчика рівня LE 1а.

У *другому контурі* автоматичного контролю необхідно контролювати температуру у реакторі для приготування і стерилізації дріжджового автолізату яка має регламентоване значення 112°C. Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у його архіві. Температура регулюється подачею води клапаном 2д та пари клапаном 2в, приводиться в дію за допомогою перетворювача 2б, 2г. Сигнал від датчика подається на контролер.

У *третьому контурі*, у виробничому ферментері необхідно контролювати рівень рідини. Рівень рідини становить 60%. Суміш, яка поступає контролюється рівнем рідини за допомогою датчика рівня LE 3а.

У *четвертому контурі*, автоматичного контролю, контролюється температура у виробничому ферментері, яка становить 30 °С. Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у його архіві. Температура регулюється подачею води клапаном 4д та пари клапаном 4в, приводиться в дію за допомогою перетворювача 4б, 4г. Сигнал від датчика подається на контролер.

У *п'ятому контурі*, автоматичного контролю, контролюється значення тиску у виробничому ферментері, який становить 0.5 МПа. Тиск контролюється за допомогою датчика тиску РТ 5а.

У *шостому контурі*, автоматичного контролю і управління, контролюється і регулюється частота обертання, яка має регламентоване значення 150 об/хв.

Спостереження за зміною частоти обертання передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у його архіві. Для управління частотою обертання ротора передбачається її зміна за допомогою частотного перетворювача ба. Для забезпечення безаварійної роботи необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» а безпосередньо біля насосів («по місцю») SB3.

5.4. Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Таблиця 5.1

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5
1	1а	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +1250С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід, точність 2мм	NMC	Kobold.
2	2а	Цифровий термометр з термопарою К-типу і датчиком температури повітря, клас точності – 1%, діапазон вимірювань: -50...750 ° С . аналоговий вхід	HYELEC MS6501	Hyelec
3	2б	Електропневмоперетворювач, вхідний сигнал - електричний 4...20 мА, вихідний сигнал - пневматичний 20 ... 100 кПа, основна похибка 0,5	PC-28G/A	APLISENS (Польща)
4	2в	Клапан регулюючий пневматичний, управляючий сигнал 20-100 кПа, робоча температура 250 ⁰ С .	PV6211	Эви инженеринг (Україна)
5	2д	Пневматичний сідельний клапан серії J4 для нейтрального та агресивного середовища, управляючий сигнал від 0 до 16 бар, розмір G3/8...G2	J4SPG1805	KRAFTt-AIR
6	3а	Ємнісний датчик рівня, матеріал: аустенітна сталь SUS 304 ; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура 800 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід.	SA128	Simple Tech

7	4a	pH електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1...12, максимальна температура до 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 6 бар	APS	Kobold
8	4б	Перетворювач вимірювання pH і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold
9	5a	Термоперетворювач опору-датчик температури, вихідний сигнал 4...20 мА, діапазон вимірювань: -196...600 ⁰ С. Матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, аналоговий вхід	BSZ	WIKА (Росія)
10	SB3	Двоклавішна кнопочка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Сучасний стан розвитку суспільних відносин з постійно зростаючим антропогенним впливом на навколишнє природне середовище вимагає зміни відношення людства до процесів виробництва та споживання товарів. Якщо раніше в основу будь-яких дій людини ставилися економічні пріоритети, то сьогодні на перший план виходять екологічні цілі. Іншими словами, на нинішньому етапі розвитку виробництва кожне рішення щодо освоєння нових або модернізації старих виробництв необхідно оцінювати з позиції зменшення негативного впливу на довкілля [104].

Сьогодні під екологізацією розуміють процес поступового і послідовного впровадження систем технологічних, управлінських та інших рішень, які дозволяють підвищувати ефективність використання природних ресурсів і умов поряд з покращенням або хоча б збереженням якості природного середовища. Це одна з головних вимог сучасності в умовах глобальної екологічної кризи. В соціально-економічному плані екологізація повинна спиратися на перехід до природозберігаючих методів господарювання, а в технічному – на екологізацію технологій виробництва і природокористування [105].

Одним із основних шляхів екологізації промисловості є вдосконалення і модернізація технології виробництва, в тому числі уловлювання викидів, та перетворення забруднювальних речовин на корисні продукти. Другий напрям екологізації виробництва полягає в очищенні викидів і стоків від забруднення [106].

					НУХТ БТЕК 04.02.32			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бахтій О.П.			РОЗДІЛ 6. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.					91	412
Реценз.		Сухоребра Л.М.				93		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

6.1. Характеристика та оцінка відходів, утворених при виробництві поверхнево-активних речовин

Етап виробництва, який є місцем утворення відходів	Характеристика відходів	Складові відходів	Приблизні об'єми за виробничий цикл (72 год)	Клас небезпеки
Миття та ополіскування обладнання	2% розчин кальцинованої соди	Кальцинована сода, бруд	2,5 м ³	3 клас
Щоденне прибирання виробничих приміщень Генеральне прибирання виробничих приміщень	0,2% робочий розчин «Супераль»	Аніонні поверхнево-активні речовини, натрій бензоат, наповнювач, комплекс ПАР і лугів, інгібітор корозії, комплексоутворювач	24,5 л	3 клас
Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л	Відпрацьоване повітря	СО ₂ , пил	–	4 клас
Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 500 л	Відпрацьоване повітря	СО ₂ , пил	–	4 клас
Отримання супернатанту культуральної рідини центрифугуванням	Відділена біомаса	Клітини продуцента	1,5 кг	4 клас
Екстракція поверхнево-активних речовин (ПАР) з супернатанту	Екстрагент (випаровування)	Метанол, хлороформ	9 л*	3 клас, 2 клас

Примітка*: за умови, що випаровування суміші метанолу та хлороформу при екстракції ПАР становить 1%.

6.2. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів та опис прийомів з їх утилізації

Пропонується застосовувати наступні заходи для зменшення об'ємів:

1) Рідких відходів:

- раціональне споживання води
- багаторазове використання

Наприклад, промислові стічні води - це відносно чиста вода, не забруднена або незначно забруднена при виробництві і відноситься до категорії 1. Вони включають теплообмінну воду, яка використовується для охолодження технологічних середовищ через поверхню теплообмінників. На них припадає найбільша кількість споживаної води. Ці води можна використовувати неодноразово в вигляді оборотньої води після охолодження в градирнях і стабілізації. Мінералізація оборотньої води зростає зі зменшенням частки прісної води, що надходить в циркулює потік. Щоб зменшити ступінь мінералізації, багато компаній використовують системи демінералізації води, наприклад, використовуючи іонообмінні смоли. У свою чергу може використовуватися забруднена вода (категорія 3), яка утворюється на проміжних технологічних стадіях, після вилучення цільового продукту, відмиття та дезінфекції технологічного та допоміжного обладнання, комунікацій, приміщень, регенерації фільтрів, сорбентів і ін. Живлять циркуляційні системи водопостачання, тому зазвичай досить механічних і фізико-хімічних методів їх очищення. Очищення рідких відходів можна проводити за допомогою аеротенків-змішувачів. Цей вибір зумовлений низкою факторів, серед яких майже повне видалення всіх забруднень і висока інтенсивність.

2) Газоподібних відходів:

Дані відходи представлені вуглекислим газом, парами розчинників (метанол, хлороформ), водяною парою та пилом. Оскільки метанол та хлороформ володіють значною леткістю, доцільним буде їх компримування за допомогою електропровідних газоперекачувальних агрегатів (ГПА), які забезпечують конденсацію даних газів за підвищеного тиску і температури та повернення їх у виробничий процес (рис.6.1).

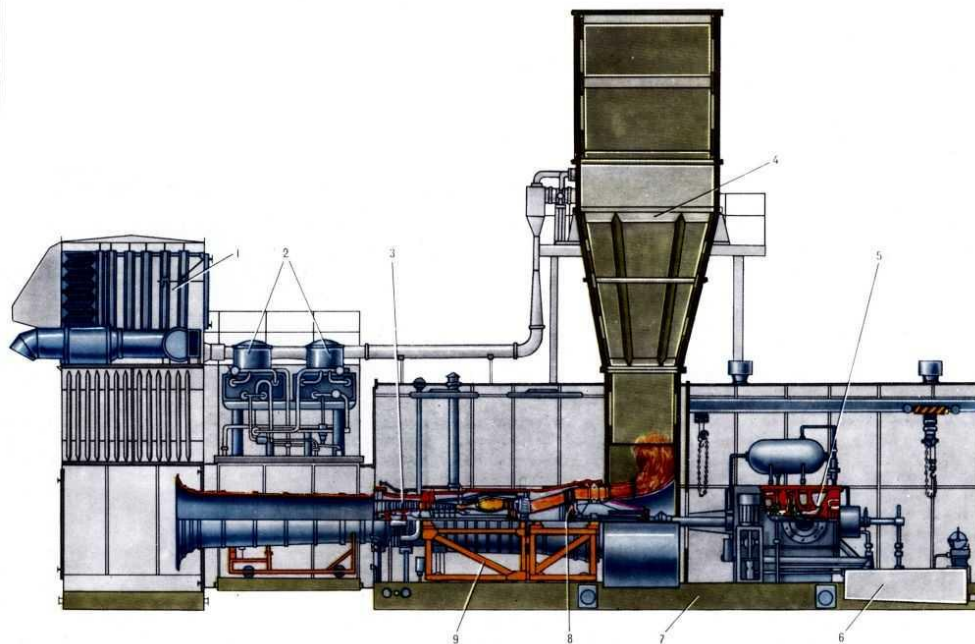


Рис. 6.1. Схема ГПА.

ГПА характеризуються високою ефективністю та надійністю, відповідністю екологічним вимогам, повною автоматизацією, зручністю експлуатації [106].

Крім цього, пропонується застосовувати наступні прийоми для **утилізації наявних відходів:**

1. Створення штучних гідроботанічних майданчиків для утилізації рідких відходів з використанням вільноплаваючих та підводних рослин (рис.6.2.).

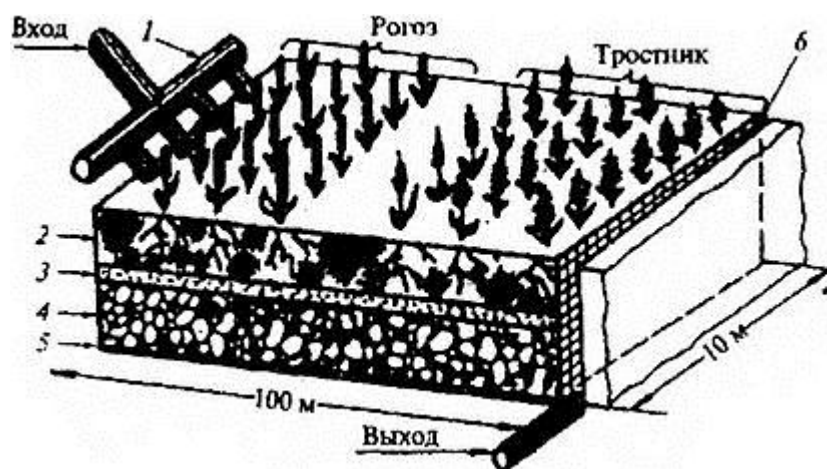


Рис.6.2. Приклад зображення гідроботанічного майданчика.

Дане рішення не потребує постійної наявності обслуговуючого персоналу, є екологічним та економічно вигідним.

2. Установка біофільтрів для очищення газоподібних відходів.

Даний вибір обумовлений тим, що біологічні фільтри прості за конструкцією і їх експлуатація не пов'язана з великими капіталовкладеннями. Найпростіший біофільтр – це ємність в землі, в якій під шар фільтрувального матеріалу (земля, торф, компост тощо) подають потік повітря, який очищається. Схема такого біофільтра, спорудженого для дезодорації повітря на одному з підприємств (Німеччина), наведена на рис. 3.

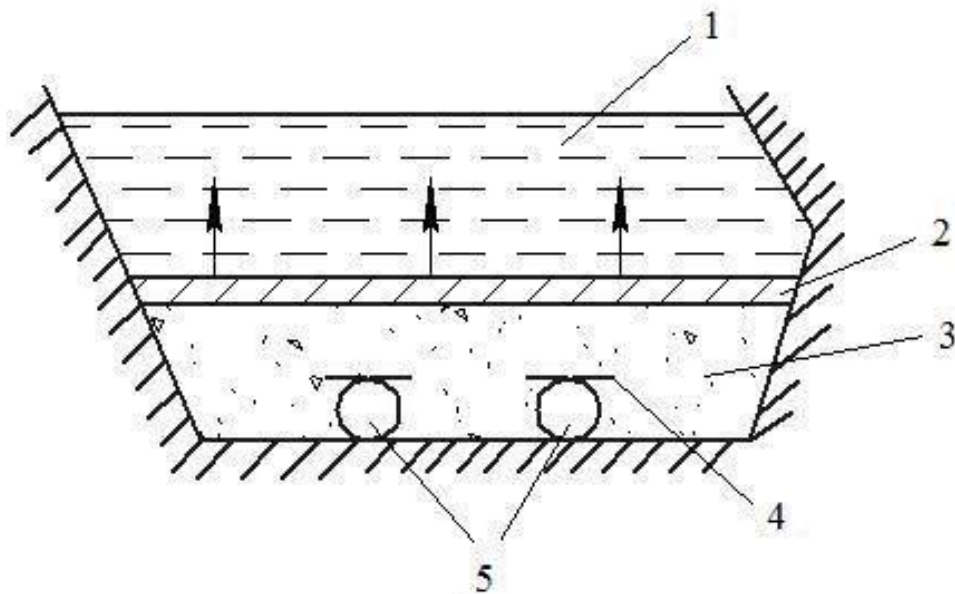


Рис. 6.3. Біофільтр для дезодорації повітря (Німеччина).

1 – свіжий компост; 2 – просіяний великий компост; 3 – великий шлак; 4 – картон, насичений бітумом; 5 – перфоровані бетонні труби [107].

3. Оскільки твердим відходом виробництва поверхнево-активних речовин (ПАР) можна вважати біомасу продуцента, яка утворюється після центрифугування культуральної рідини, доцільним буде повторне використання біомаси після виявлення життєздатних клітин.

Реалізацію цього рішення можна навести у вигляді схеми:

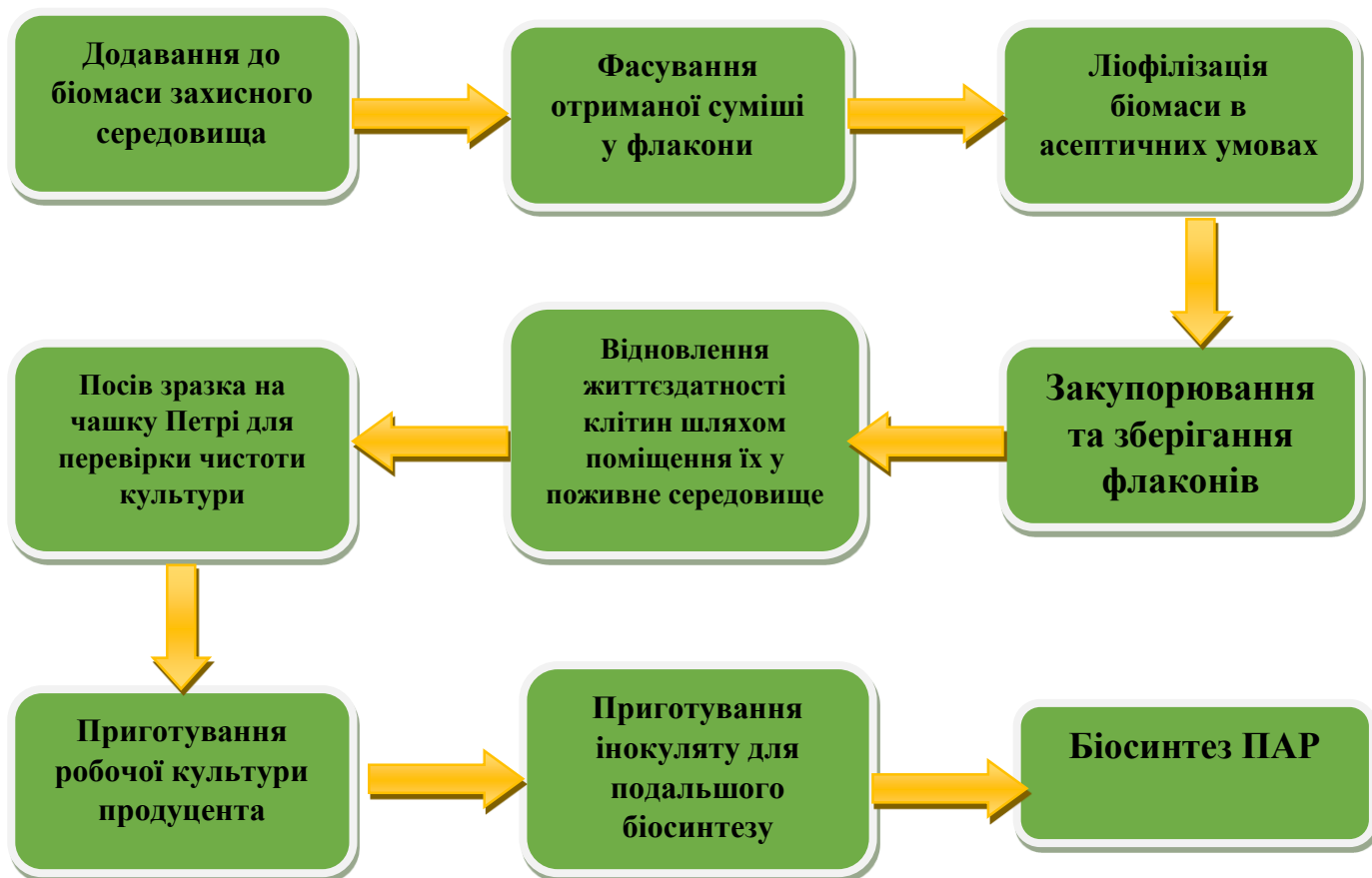


Рис.6.4. Реалізація біомаси

Захисне середовище являє собою суміш 40%-ї желатози та 25%-ї сахарози та додається для збереження клітини при ліофілізації. Перевагою ліофілізату є довгий термін збереження культури з подальшим її використанням без втрати ефективності.

6.3. Висновки. Перспективи впровадження систем екологізації даного виробництва

На основі вищеописаного можна зробити висновок про те, що виробництво поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 має відносно невеликі об'єми рідких, твердих та газоподібних відходів, рівень токсичності яких є низьким. Проте зменшити кількість наявних відходів, покращити процес виробництва та в цілому здійснити його екологізацію можна застосуванням певних прийомів:

1) Рационального використання водних ресурсів, що передбачає очищення відпрацьованої води та повторне її використання;

2) Створення на території виробництва гідроботанічних майданчиків, які здатні до екстенсивної утилізації рідких відходів без шкідливого впливу на навколишнє середовище;

3) Стиснення парів розчинників, які використовуються для екстракції поверхнево-активних речовин, з подальшою їх конденсацією у спеціальних установках та поверненням у виробничий процес;

4) Установка біофільтрів для звільнення відпрацьованого повітря від пилу і т.д. із застосуванням компосту;

5) Повторне використання біомаси продуцента для наступного біосинтезу цільового продукту після ліофілізації та подальшої активації клітин.

В цілому ці заходи не тільки дозволяють виробництву відповідати екологічним вимогам, але і сприяють економії коштів для підприємства.

ВИСНОВКИ

1. У роботі проводили дослідження синергізму поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 разом з антифунгальними засобами. Продуцента культивували на чотирьох різних середовищах з метою отримання ПАР, що проявляють антифунгальні властивості. У роботі було показано здатність штаму рости на середовищі з внесенням промислових відходів, а також синтезувати ПАР, що мають антифунгальні властивості

2. У роботі було проаналізовані літературні дані, щодо застосування протигрибкових препаратів разом з біоцидним речовинами. Було показано, що використання поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 разом з клотримазолом і флуконазолом вводиться вперше. На основі власних експериментів було виявлено позитивний результат та підтвердження синергічної дії цих препаратів.

3. У експериментальній частині було досліджено синергізм поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 разом з антифунгальними препаратами (клотримазол, флуконазол). Виявлено, що МІК клотримазолу становив 3,9-125 мкг/мл, при цьому в суміші - 8,5-38 мкг/мл для тест культур *C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2, *C. utilis* БМС-65. Аналогічно і для флуконазолу.

4. У кваліфікаційній роботі розроблено технологічну та апаратурну схем біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) штамом *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, який на середовищі з 4 % (об'ємна частка) відпрацьованої олії після смаження картоплі фрї здатен синтезувати 3,9 г/л ПАР. Розчин ПАР пропонується використовувати у суміші з антифунгальними препаратами для потенційного застосування у ветеринарії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Міхеєв О.А. Перспективи застосування рослинних олій як протигрибкових засобів. Запорізький медичний журнал. – 2017. – Т. 19, № 2(101). – С. 221–226
2. Gustavo R., Santana B., Figueiredo P. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. *Microb. Pathogenesis*. 2018, 124: 152–162. doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.027.
3. Basavegowda N.L., Patra J.K., Baek K.H. Essential oils and mono/bi/tri-metallic nanocomposites as alternative sources of antimicrobial agents to combat multidrug-resistant pathogenic microorganisms: An Overview. *Molecules*. 2020; 25(5): 1058. doi: 10.3390/molecules25051058
4. Gradinaru A.C., Trifan A., Şpac A., Brebu M., Miron A. Antibacterial activity of traditional spices against lower respiratory tract pathogens: combinatorial effects of *Trachyspermum ammi* essential oil with conventional antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 2018, 67(5): 449-457. doi: 10.1111/lam.13069.
5. Пирог Т. П., Ключка Л. В., Ключка І. В., Антонюк С. І., Бахтій О. Л., Жалюк Д. В. Синергізм антимікробної активності суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ АС-5017 з іншими біоцидними сполуками. Наукові праці НУХТ . 2020, 26 (5). 17-25
6. Пирог Т. П., Ігнатенко С. В. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва. *Біотехнологія*. 2008, 1(4): 29 – 38.
7. Пирог Т. П., Леонова Н. О., Савенко І. В., Іутинська Г. О. Перспективи використання метаболітів *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 у сільському господарстві. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2015,21: 18–24.
8. Пирог Т.П., Павлюковец І. В., Ивахпюк К. А., Савенко І. В. Биотрансформация бактериями рода *Acinetobacter* отработанного подсолнечного масла в поверхностно-активные вещества и экзополисахариды. *Вещь Нацыянальнай Акадэми Навук Беларусі* 2015, 4, 117-120.

9. Calvo C., Manzanera M., Silva-Castro G.A., Uad I., Gonzalez-Lopez J. Application of Bioemulsifiers in Soil Oil Bioremediation Processes. Future Prospects. *Sci Total Environ.* 2009, 407(12):3634-40. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.07.008
10. Langeveld W. T., Veldhuizen J. A., Burt S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014, 40(1), 76–94. Doi:10.3109/1040841X.2013.763219
11. Ying L., Wenqiang C., Ming Z., Xiaobin L., Yang J. and Hongxiang L. Synergistic and drug-resistant reversing effects of diorcinol D combined with fluconazole against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. 2015, 15(2). doi: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov001>.
12. Perlin D.S., Rautemaa-Richardson R., Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 2017,179(12):383-392. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.
13. Langeveld W. T.; Veldhuizen J. A.; Burt S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014, 40(1), 76–94. Doi:10.3109/1040841X.2013.763219
14. Zarith A.A., Siti H. S., Alptug K.E. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. *Cur. Drug Metab.*, 2018, 19(13): 1100-1110. doi: 10.2174/1389200219666180723144850.
15. Tariqa S., Wania S., Rasoola W., Shafia K., Bhata M. A., Prabhakar A., Shallaa A. H. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb. Pathogenesis*. 2019, 134. doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580.
16. Budzynska A., Rozalska S., Sadowska B., Rozalska B. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* dual-species biofilm as a target for the combination of essential oils and fluconazole or mupirocin. *Mycopathologia*. 2017, 182, 989–995. doi.org/10.1007/s11046-017-0192-y

17. Ait D.L., Ait S.B. Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Ind. Cr. and Prod.* 2017, 109(15): 746–752. doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.028.
18. Zhang J., Wu H., Dan J., Yongan Y., Wenjian T., Kehan X. The antifungal activity of essential oil from *Melaleuca leucadendra* grown in China and its synergistic effects with conventional antibiotics against *Candida*. *Natural Product Research.* 2018, 1(4): 2545-2548. doi:10.1080/14786419.2018.1448979.
19. Rosato A.P., Carocci A.T., Catalano A.H. Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. *Plos one.* 2018, 13(8). doi:10.1371/journal.pone.0200902.
20. Dias C. R., Murielly P.T., Morais D.L. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity. *Complementary and Alternative Medicine.* 2015 (15). Doi: 10.1186/s12906-015-0947-2.
21. Kissels W., Wu X., Santos R. R. Short communication: Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract from calves. *J. Dairy Sci.* 2017, 100 (2), 970–974. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11536>
22. Ersilia A., Sumalan R.M., Dancin C., Obistioiu D., Negrea M. Synergistic antifungal, allelopathic and anti-proliferative potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules,* 2018, 23: 185 doi:10.3390/molecules23010185
23. Essida R., Gharbia D., Abidb G., Karkoucha I., Hamoudaa T. B., Faresa N., Trabelsib D., Mhadhbib H., Elkahouia S., Limama F., Tabbenea O. Combined effect of *Thymus capitatus* and *Cinnamomum verum* essential oils with conventional drugs against *Candida albicans* biofilm formation and elucidation of the molecular mechanism of action. *Industrial Crops & Products,* 2019. doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111720

24. Nidhi, P., Rolta, R., Kumar, V., Dev, K., Sourirajan, A., Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*, *Journal of Ethnopharmacology*, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113135>.

25. Essid R., Hammami M., Gharbis D., Karkouch I. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Doi: 10.1007/s00253-017-8442-y 2017

26. Pirog T. P., Kliuchka I. V., Kliuchka L. V. Synergistic action on microorganisms of complex of essential oils with the biocides. *Biotechnologia acta*, 2019 12(4). doi.org/10.15407/biotech12.04.005

27. Fait M.E., Costa P.S., Freitas D.T., Bakas L., Morcelle S.R. Antifungal activity of arginine-based surfactants. *Curr Bioact. Compd.* 2019, 14(1) <https://doi.org/10.2174/1573407214666180131161302>

28. Fait M. E., Bakas L., Graciela L. G., Morcelle S. R. Cationic surfactants as antifungal agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2018.

29. Tabbene O., Grazia A., Azaiez S., Slimene I. Synergistic fungicidal activity of the lipopeptide bacillomycin D with amphotericin B against pathogenic *Candida* species. *FEMS Yeast Research*. 2015, 15(4). doi: 10.1093/femsyr/fov022.

30. Tabbene O., Azaiez S., Grazia A., Karkouch I. Bacillomycin D and its combination with amphotericin B: promising antifungal compounds with powerful antibiofilm activity and wound-healing potency. *Jour. of Appl. Microb.* 2015, 289-300

31. Procópio T.F., Moura M.C., Albuquerque L.P., Gomes F.S., Santos N.D.L, Coelho L.C.B.B., Pontual E.V., Napoleão T.H. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential, in: antibacterials: synthesis, properties and biological activities. *Nova Science Publishers Inc.* 2017, 98: 69–89. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.019.

32. Silva M., Lima C. D., Lopes Rocha C. H. Synergism between fluconazole and *Terminalia catappa* extract and its use in the treatment of *Candida*-infected

Tenebrio molitor Larvae. *Braz. J. of Develop., Curitiba*, 2020, 6.
DOI:10.34117/bjdv6n10-358

33. Wen C., Chen J., Zhang D. Pseudolaric acid B induces mitotic arrest and apoptosis in both 5-fluorouracil-sensitive and -resistant colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 2016, 383(2), 295–308. doi:10.1016/j.canlet.2016.09.007

34. Liu M.L., Sun D., Li T., Chen H. A systematic review of the immune-regulating and anticancer activities of Pseudolaric Acid B. *Front Pharmacol.* 2017, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00394

35. Li Z., Yin H., Chen W., Jiang C., Hu J. Synergistic effect of pseudolaric acid B with fluconazole against resistant isolates and biofilm of *Candida tropicalis*. *Infection and Drug Resistance*, 2020.

36. Li, F., Yu, J., Yang, H., Wan, Z., Bai, D. Effects of ambroxol on alginate of mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr. Microbiol.* 2018, 57, 1–7. doi: 10.1007/s00284-008-9142-8

37. Li X., Zhao Y., Huang X. Ambroxol hydrochloride combined with fluconazole reverses the resistance of *Candida albicans* to Fluconazole. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00124

38. Клотримазол – інструкція щодо використання. Електронний ресурс [Режим доступу]: [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[27170\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[27170])

39. Флуконазол – інструкція щодо використання. Електронний ресурс [Режим доступу]: [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[12920\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[12920])

40. Pirog T. P. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Biotechnologia acta.* 2016. Vol. 9, N 1. – P. 38–47.

41. Пирог Т. П. Антимикробные свойства поверхностно-активных веществ, синтезированных в различных условиях культивирования

Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241. Микробиол. журн. 2016. Т. 78, № 3. С. 2–12.

42. Santos D. K. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17.

43. Pirog T.P., Lutsai D.A., Shevchuk T.A., Iutynska G.O. Synthesis and biological activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants depending on monovalent cations content in cultivation medium. *Mikrobiol. Z.* 2021; 83(2):20-31.

44. Pirog T, Shulyakova M, Sofilkanych A, Shevchuk T, Maschenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac -5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food Bioprod. Proces.* 2015, 93(1): 11–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.003>

45. Pirog T.P., Konon A.D., Sofilkanich A.P., Iutinskaya G.A. Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013, 49 (4). 360–367

46. Pirog T.P., Chebotaryova K. Antiadhesive properties of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 extracellular metabolites. *Ukrainian Food Journal.* 2013, 2(2): 192-197.

47. Mazzola P., Jozala A., Lencastre-Novaes L., Moriel P., Vessoni-Penna T. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents // *Braz. J. Pharm. Sci.* – 2009. – 45, N 2. – P. 241–248.

48. Mohamed S. H., Mohamed M. S. M., Khalil M. S., Azmy M., Mabrouk M. I. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J. Appl. Microbiol.* 2018; 125(1), 84—95. doi: 10.1111/jam.13755.

49. Carbone C., Teixeira, M. C., Sousa M.C., Martins-Gomes C. Clotrimazole-Loaded Mediterranean Essential Oils NLC: A Synergic Treatment of *Candida* Skin Infections. *Pharmaceutics*, 2019, 11(5), 231

50. Grimling B., Karolewicz B., Nawrot U., Włodarczyk K., Górniak A. Physicochemical and Antifungal Properties of Clotrimazole in Combination with High-Molecular Weight Chitosan as a Multifunctional Excipient. *Marine Drugs*, 2020, 18(12), 591

51. Sakineh J. S., Fahimeh A., Alireza K. Interaction of *Candida albicans* with fluconazole/ clotrimazole: effect on hyphae formation and expression of hyphal wall protein. *International Journal of Medical Laboratory*. 2020, 7(2):110-120.

52. Liu Xinning; Li Tao; Wang Decai; Yan Yilei; Sun, Wenwen. Synergistic antifungal effect of fluconazole combined with licofelone against resistant *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8.

53. Liu, Wei; Li, Li Ping; Zhang, Jun Dong; Li, Qun. Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole. *PLoS ONE*, 2014, 9(7).

54. Banat I. M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M. G., Fracchia L., Smyth T. J., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87(2): 427–444.

55. Пирог Т.П., Конон А.Д. Мікробні поверхнево–активні речовини. I. Гліколіпіди. *Biotechnologia acta*. 2014, 7(1): 9–30

56. Parthipan P, Elumalai P, Sathishkumar K, Sabarinathan D, Murugan K, Benelli G, Rajasekar A. Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *Biotech.* 2017;7(5):278. doi:10.1007/s13205-017-0902-7.

57. Bao M., Pi Y., Wang L., Sun P. Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter sp.* D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environ. Sci. Process. Impacts* 2014, 16: 897–903.

58. Pirog T. P., Shulyakova M. O., Nikituk L. V., Antonuk S. I., Elperin I. V. Industrial waste bioconversion into surfactants by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405. *Biotechnologia Acta* 2017, 10(2), 22-33

59. Пономаренко Г. В. Особливості поширення захворювання на дерматофітози серед свійських собак і котів міста Харкова. *Ветеринарна медицина України*. 2019. doi: 10.31890/vtpp.2019.03.26
60. Андрейчин М.А., Кундієв Ю.І., Копча В.С. Проблема професійних інфекційних хвороб. *Український журнал з проблем медицини праці*, 2012, 30(2): 66-78.
61. Старовойтова С.О., Орябінська Л.Б., Лубенець В.І. Спектр антимікробної дії протигрибкового препарату Есулан. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2015, 3: 68-75
62. Коваленко В. Л., Нестеренкова В. В., Ничик С. А., Терекшко Б. М. Дерматофітози дрібних тварин. *Ветеринарна медицина України.*, 2017. 166-173.
63. Тихонов А. И., Фролова О. Е., Гудзенко А. П., Барнатович С. В. Маркетингові дослідження ринку протигрибкових лікарських засобів для місцевого застосування. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*, 2016, 2: 77-81.
64. ДК Противогрибковая Эмульсия (200 г). Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://33korovy.in.ua/product/dk-protivogribovaya-emulsiya-200-g-hbf>
65. Микосепт - противогрибковое средство 10 мл. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://lapo4ka.com/mikosept-protivogribovovoe-sredstvo-10-ml>
66. Санодерм - крем для лікування дерматомікозів. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://www.zooapteka.kiev.ua/ua/arterium-sanoderm-krem>
67. Мазь Клотримазол-Вет 50г с широким противогрибковым действием. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://vetapteka-litarova.com.ua/maz-klotrimazol-vet-50g-s-shirokim-protivogribovym-dejstviem-ukrvetbiofarm-2/>
68. Имаверол 100мл (противогрибковый наружный). Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://best-zoomag.com.ua/p866936081-imaverol-imaverol-100ml.html>

69. Крем Триосан для 20гр кошек и собак. Электронный ресурс. [Режим доступа]: <https://vetapteka-litarova.com.ua/krem-triosan-dlja-20gr-koshek-i-sobak-64-sht/>

70. Спрей стоп лишай и грибок 30 мл Электронный ресурс. [Режим доступа]: <https://zoovetbaza.com.ua/p246909800-sprej-stop-lishaj.html>

71. Крем Сан Д 20 г Якісна допомога O.L.KAR Электронный ресурс. [Режим доступа]: <https://vetapteka-litarova.com.ua/krem-san-d-20-g-jakisna-dopomoga-o-l-kar/>

72. Клотримазол інструкція по застосуванню. Электронный ресурс. [Режим доступа]: <https://compendium.com.ua/dec/267274/>

73. Хуснутдинова Н.С., Мещерякова С.А., Шумадалова А.В., Султанова Р.М. Антимикробная и фунгицидная активность 2-амино-тиазолов, содержащих дитерпеновый фрагмент. Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов. 2019. С. 234-236

74. Pirog T. P., Antonuk S. I., Elperin I. V. The properties of surfactants synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on refined and waste sunflower oil. *Biotechnologia Acta*, 2018, 6(2): 82-88

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

76. Пономаренко Г. В. Особливості поширення захворювання на дерматофітози серед свійських собак і котів міста Харкова. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*. 2020, 5: 116-120, DOI: 10.31890/vttp.2020.05.21

77. Пирог Т.П., Луцай Д.А., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О., Ельперін І.В. Антимікробна та антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на технічному гліцерині.

78. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.

79. Повітрозбірник фірми: «НПЦ Вектор-Кондвент». Електронний ресурс. [Режим доступу]: <http://www.etml.ru/A1I-019.html>

80. Фільтр G3. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://ventfilter.kiev.ua/p/252584136-filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelnyy/>

81. Компресор серії DVK D. Електронний ресурс. [Режим доступу]: https://dalgakiran.ua/store/product/Seriya_DVK_s_pryamyim_privodom_DVK_60_B_D_-_430_D

82. Теплообмінник-охолоджувач. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://ankort.com/katalog/razbornye-plastinchatye-teploobmenniki/>

83.Ресивер Р 180.370. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <http://www.kongyr.com.ua/resiver-vozdushniy-vertikalniy-rv-180-370/>

84. Теплообмінник-нагрівач . Електронний ресурс. [Режим доступу]: <http://ventklimat.com.ua/products/vodyanoj-nagrevatel-aerostar-swh-50-30>

85. Головний фільтр очистки повітря. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://air-part.ru/product/lamelnyy-filtr-Infastaub/>

86. Індивідуальний фільтр очистки повітря. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://www.precisionfiltration.com/productpdfs/Ultradept%20II%20P-SRF%20Filter.pdf>

87. Інокулятор об'ємом 5 л. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://www.knikbio.com/ru/stainless-steel-fermentor-with-magnetic-agitation-l-51.html>

101 Реактор-змішувач об'ємом 50 л. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/>

89. Насос. Електронний ресурс. [Режим доступу]:
<https://www.ampika.ru/oborudovanie.html?razdel=53>

90. Інокулятор об'ємом 50 л. Електронний ресурс. [Режим доступу]:
[https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyishlennyye\)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(-kitaj\)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bole.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyishlennyye)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(-kitaj)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bole.html)

91. Реактор-змішувач об'ємом 400 л. Електронний ресурс. [Режим доступу]:
<https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mexanicheskie-meshalki/jakornaja-meshalka-v004-m3-063-m3.html>

92. Збірник для відпрацьованої олії. Електронний ресурс. [Режим доступу]: http://euromash.kiev.ua/ru/sborniki_email_ru.php

93. Реактор-змішувач об'ємом 5 л. Електронний ресурс. [Режим доступу]: <https://promvit.com.ua/category/mashiny-po-prigotovleniyu/>

94. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / К.: НУХТ, 2020.

95. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Иутинская Г.А. Действие поверхностноактивных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас5017 и *Nocardia vaccinii* К8 на фитопатогенные бактерии. *Прикл. биохим и микробиол.* 2013, 49(4): 364–371.

96. Пирог Т. П., Леонова Н. О., Савенко І. В., Іутинська Г. О. Перспективи використання метаболітів *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 у сільському господарстві. *Сільськогосподарська мікробіологія.* 2015,21: 18–24.

97. Wu D, Li X, Lu J, Chen J, Xie G, Zhang L. Constitutive expression of the DUR1,2 gene in an industrial yeast strain to minimize ethyl carbamate production during chinese rice wine fermentation. *FEMS Microbiol.* 2016 363(1):fnv214. doi: 10.1093/femsle/fnv214

98. Knorst M T, Neuberg R, Wohlrab W. Analytical methods for measuring urea in pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed.* 1997, 15:1627- 1632

99. Автоматизація виробництва [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/8890/avtomatizaciya-virobnictva>

100. Ельперін І.В. Автоматизація виробничих процесів: підручник / І.В.Ельперін, О.М.Пупена, В.М.Сідлецький, С.М.Швед. – Вид. 2-ге виправлене – К.: Вид. Ліра-К, 2015. – 378 с.

101. Ельперін, І.В., Швед С.М. Автоматизація систем управління технологічними процесами: Конспект лекцій до вивчення дисципліни для студентів спеціальності 6.08040 «Інформаційні управляючі системи та технології напряму підготовки 0804 «Комп'ютерні науки» - К6НУХТ, 2007. – 71 с.

102. Banat I. M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M. G., Fracchia L., Smyth T. J., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87(2): 427–444.

103. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Антонюк С.И., Кравченко Е.Ю., Иутинская Г.А. Влияние одновалентных катионов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241. *Мікробіол. журн.* 2013, 75(2): 10-20.

104. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.economy.nayka.com.ua/?op=1&z=1624> .

105. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://snpo.ua/uk/produktsiya/ustatkuvannya-tehnologichne-naftogazo/gazoperekachuvalni-i-turbokompresorni-agregati> .

106. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://web.posibnyky.vntu.edu.ua/iebmd/severin_priodoohoronni_tehnologii/6-6.html .

107. Борейко В.І. Економіка довкілля та природокористування: Навч. посібник. – Рівне: НУВГП, 2011. – 255 с.

ДОДАТКИ

Апробація результатів науково-дослідної роботи

Статті у журналах:

1. Пирог Т. П., Ключка Л. В., Ключка І. В, Антонюк С. І., Бахтій О. Л, Жалюк Д. В Синергізм антимікробної активності суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus Erythropolis* ІМВ АС-5017 з іншими біоцидними сполуками. Наукові праці Національного університету харчових технологій. – 2020. – Т. 26, № 5. – С. 17–25.

Тези у збірниках міжнародних та всеукраїнських конференцій:

1. Пирог Т.П., Бахтій О.Л. Антимікробна активність суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та антифунгальних лікарських засобів // Матеріали VIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів– 2020, С. 77.

2. Бахтій О., Ключка Л., Пирог Т. Синергізм антимікробної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та антифунгальних лікарських засобів // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.). – Ч. 1.– С. 367.

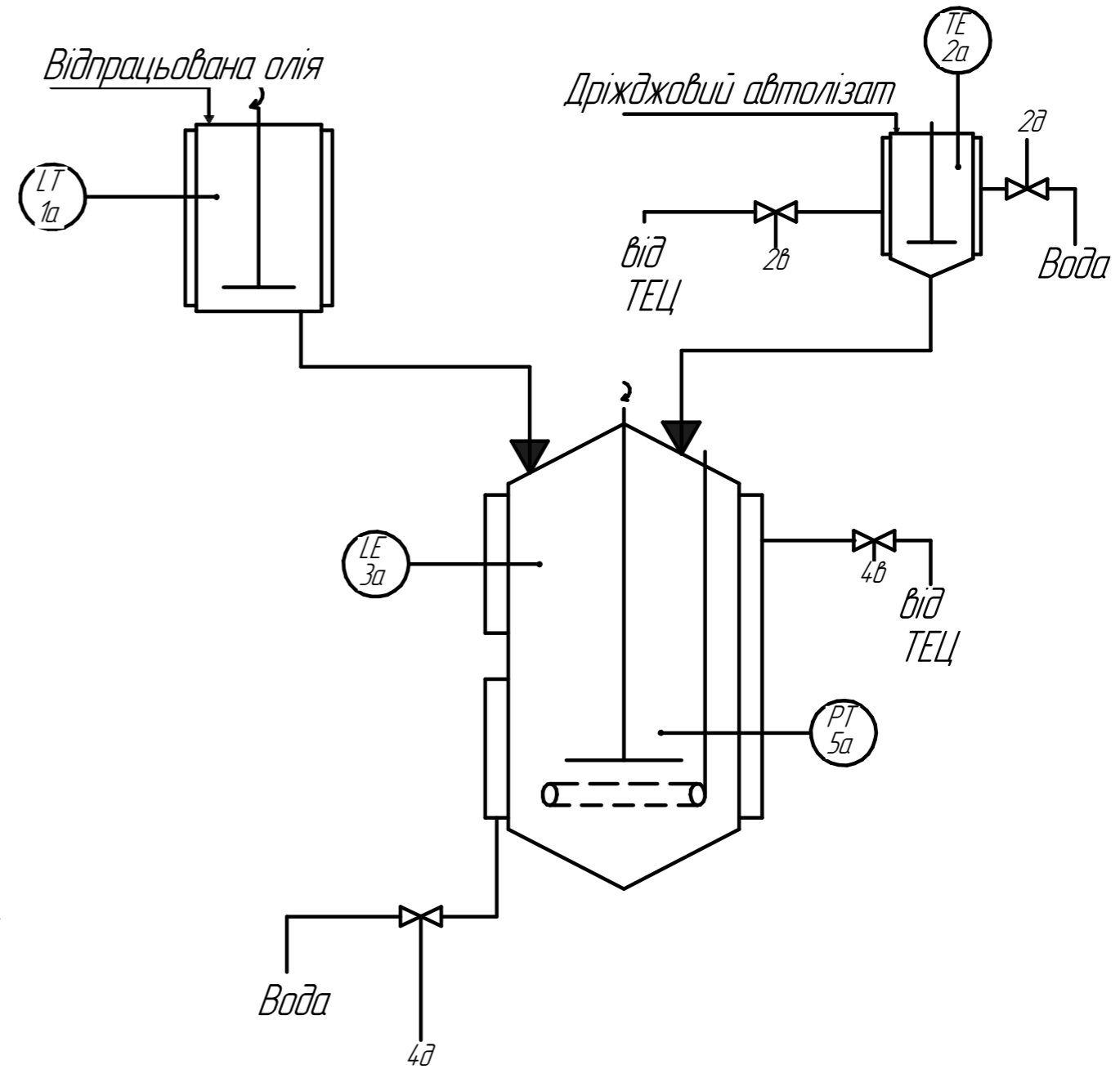
3. Бахтій О.Л., Пирог Т.П. Антимікробна активність суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та антифунгальних лікарських засобів // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, 20 травня 2020 р.) – С. 16.

4. Пирог Т.П., Бахтій О.Л. Синергізм антимікробної дії комплексу мікробних поверхнево-активних речовин та антифунгальних засобів. Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції: Програма та тези матеріалів ІХ-ї Міжнародної науково-технічної конференції, 10-11 листопада 2020 р., м. Київ. – К.: НУХТ, 2020 р. – 35-36 с.

5.Бахтій О.Л., Пирог Т.П. Руйнування біоплівки за дії суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 та антифунгальних засобів // Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (м. Харків, 26 листопада 2020 р.). – С. 98.

6.Бахтій О.Л., Ключка І.В., Пирог Т.П. Антифунгальна активність суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В7241 та ефірних олій. Біологічні дослідження – 2021: Збірник наукових праць. – Житомир, ПП "Євро-Волинь": 2021.- 285с.

НУХТ 04.04. КР ГЧ



1 2 3 4 5 6 7 8 9 4

80%±3 112°C±2 60%±3 150 об/хв

Прилади місцеві	LT 1a	TE 2a		LE 3a			PT 5a	H SB3
Прилади на щиті			TY 3b ^{Ep}	TY 3z ^{Ep}	TY 4b	TY 4z		SIL 4a
ПЛК	Y	•	•	•	•	•	•	•
	BA	•						
	BD							
	AB		•	•	•	•	•	•
ПК	DB							
	C	•	•	•	•	•	•	•
	S							
	I	•	•	•	•	•	•	•
ПК	R	•	•	•	•	•	•	•
	C	•	•	•	•	•	•	•
	S							
	A							•

Изм.	Лист	№ докум.	Подп.	Дата
Разраб.		Бахиті О.Л.		
Проб.		Клименко О.М.		
Т.контр.				
Н.контр.				
Утв.				

НУХТ 04.04. КР ГЧ		
Схема автоматизації ділянки виробничої ферментації	Лит.	Масштаб
		1:1
	Лист	Листов 1
Кафедра БТМ		
Формат А3		

КУМАС-301811 Україна версія © 2019 ООО "АКОН-Системы протекторанги", Россия Все права защищены.
 Копіювати не можна без дозволу.

Перв. примен.
 Справ. №

Подп. и дата
 Взам. инв. №
 Инв. № подл.
 Подп. и дата

Не для коммерческого использования

Копировал