

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему:
«Технологія біосинтезу молочної кислоти»

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи ББТ-20
Макаренко М.В.
Науковий керівник: к.т.н., доц. Волошина І.М.
Рецензент: к.т.н., доц. Грецький І.О.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
«__» _____ 20__ р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Макаренко Микиті Володимировичу**

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Технологія біосинтезу молочної кислоти**

Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «01» березня 2024 року № 49-уч

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо технології біосинтезу молочної кислоти; матеріали переддипломної практики

3. Зміст кваліфікаційної роботи: техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва, характеристика біологічного агента, опис технологічної схеми, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додаток.

4. Дата видачі завдання 01.03.2024 р

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	02.04.2024	
2	Розділ 1 Техніко-економічне обґрунтування	05.04.2024	
3	Розділ 2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	26.04.2024	
4	Розділ 3 Характеристика біологічного агента	10.05.2024	
5	Розділ 4 Опис технологічної схеми	30.05.2024	
6	Розділ 5 Контроль якості	31.05.2024	
7	Висновки	04.06.2024	
8	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	07.06.2024	
9	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку	10.06.2024	
10	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 14 днів дозахисту)		
11	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
12	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Микита МАКАРЕНКО

Науковий керівник _____ Ірина ВОЛОШИНА

АНОТАЦІЯ

Макаренко М.В. Технологія біосинтезу молочної кислоти – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія. - Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

Кваліфікаційну роботу присвячено технології виробництву молочної кислоти біотехнологічним способом за допомогою штаму *Escherichia coli* WYZ-L до стадії очищення та концентрування. У роботі обґрунтовано технологію біосинтезу молочної кислоти на основі *E. coli* WYZ-L, представлено технологічну схему отримання культуральної рідини. Обґрунтовано вибір ефективного продуцента, умови культивування, склад поживного середовища та технологічного обладнання. Проведено розрахунки для визначення обсягів виробництва та реалізації технологічної схеми. Технологічна схема складається з трьох блоків: допоміжні роботи (ДР); технологічний процес (ТП); знешкодження відходів (ЗВ). Обґрунтовано та представлено методики контролю якості.

Ключові слова: молочна кислота, E. coli WYZ-L, культивування, біосинтез, контроль.

					КР.ПЗ.162.08				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	АНОТАЦІЯ				
Розроб.	Макаренко М.В.								
Перевір.	Волошина І.М.								
Консультант									
Н. Контр.									
Затверд.	Мокроусова О.Р.								
					Літ.	Арк.	Аркушів		
					КНУТД, ББТ-20				
					4				

ABSTRACT

Makarenko M. V. Technology of lactic acid biosynthesis – Manuscript.

Qualification work on specialty 162 Biotechnology and bioengineering. -
Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2024.

The qualification work is devoted to the technology of lactic acid production by biotechnological method using strain *Escherichia coli* WYZ-L before the stage of purification and concentration. The paper substantiates the technology of biosynthesis of lactic acid based on *E. coli* WYZ-L, and presents the technological scheme for obtaining culture liquid. The choice of an effective producer, cultivation conditions, the composition of the nutrient medium and technological equipment are substantiated. Calculations were made to determine the volume of production and implementation of the technological scheme. The technological scheme consists of three stages: Auxiliary works (DR); Technological process (TP); Waste disposal (WW). Quality control methods are substantiated and presented.

Key words: lactic acid, E. coli WYZ-L, cultivation, biosynthesis, control.

					КР.ПЗ.162.08				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Макаренко М.В.							
Перевір.		Волошина І.М.							
Консультант						КНУТД, ББТ-20			
Н. Контр.									
Затверд.		Мокроусова О.Р.							
					5				

ЗМІСТ

_Тос169456426ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1	11
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	11
1.1. Характеристика молочної кислоти.....	11
1.2 Потреба у цільовому продукті.....	12
1.3 Розрахунок потужності виробництва	13
1.3.1 Розрахунок кількості молочної кислоти необхідної для виробництва достатньої кількості полілактиду	13
1.3.2 Розрахунок потужності виробництва молочної кислоти <i>E. coli</i> WYZ–L13	
1.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання необхідного об'єму культуральної рідини для забезпечення річної потреби в цільовому продукті та розрахунок об'єму ферментера.....	14
РОЗДІЛ 2	15
ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища	15
2.1.1. Обґрунтування вибору біологічного агента.....	15
Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	16
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу.....	20
2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера	20
2.2.2 Вибір миючих та дезінфікуючих засобів.....	21
2.2.3.1 Обґрунтування вибору миючого засобу	22
2.2.3.2 Дезінфекційні засоби	24
2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації.....	27
2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	27

					КР.ПЗ.162.08			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.						
Перевір.		Волощина І.М.						
Консультант						КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.								
Затверд.		Мокроусова О.Р.						

2.3.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 300 л.....	28
2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л.....	28
2.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в струшувальних колбах.....	29
2.3.5 Параметри стерилізації компонентів поживного середовища	29
2.3.5.1 Вирощування посівного матеріалу в колбах.....	30
2.3.5.2 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л	30
2.3.5.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л	30
2.3.5.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 м ³	31
РОЗДІЛ 3	32
ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	32
3.1 Таксономічний статус.....	32
3.2 Морфолого-культуральні властивості	32
3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки	33
3.4 Отримання штаму <i>E. coli</i> WYZ – L	33
РОЗДІЛ 4	34
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	34
РОЗДІЛ 5	45
КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	45
5.1 Методи контролю молочної кислоти.....	45
5.2 Методи контролю на стадії біосинтезу.....	46
5.2.1 Мікробіологічний контроль композицій поживного середовища та готового	47
5.2.2 Визначення біомаси продуценту	48
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51
ДОДАТКИ.....	53

ВСТУП

Актуальність теми. Проблема забруднення нашої планети пластиком завжди знаходиться на вустах. Одним із вирішень цієї проблеми є використання біорозкладного пластику замість звичайного. Одним із перспективних видів біорозкладного пластику є полімолочна кислота (полілактид, PLA). Для виробництва цього пластику необхідна молочна кислота. Щоб PLA міг скласти конкуренцію більш дешевим звичайним видам пластику, необхідно розробляти більш економічно ефективні способи виробництва сировини, тобто молочної кислоти.

Метою і завдання є розробка технології отримання молочної кислоти за допомогою штаму *E. coli* WYZ-L

Завданнями дослідження є:

- проаналізувати статистику відвідування закладів швидкого харчування, визначити кількість пластикового посуду яка використовується та розрахувати потужності виробництва;
- проаналізувати наукову літературу пов'язану з удосконаленням мікробного синтезу молочної кислоти;
- проаналізувавши літературу, обрати продуцент спираючись на його економічну ефективність;
- обґрунтувати стадії технологічного процесу;
- описати стадії допоміжних робіт та стадії технологічного процесу до виділення готового продукту;
- зазначити методи контролю якості поживного середовища та культуральної рідини під час та після біосинтезу.

					КР.ПЗ.162.08			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.						
Перевір.		Волошина І.М.						
Консультант						КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.								
Затверд.		Мокроусова О.Р.						

Об'єкт дослідження – продуценти молочної кислоти

Предмет дослідження – розробка економічно ефективної технології отримання молочної кислоти за допомогою генно модифікованого штаму кишкової палички.

Методи дослідження – аналіз та огляд наукових, статей електронних ресурсів, державних стандартів щодо біосинтезу молочної кислоти за допомогою мікроорганізмів.

Інформаційна база дослідження – наукові статті, електронні джерела, наукові журнали, державні стандарти, підручники, методичні вказівки.

Новизна одержаних результатів полягає у використанні штаму *E. coli* WYZ-L для синтезу молочної кислоти, генна модифікація та адаптивна еволюція якого дозволяє йому ефективніше зброджувати сахарозу [4, 5].

Практичне значення одержаних результатів – часткова заміна пластикового посуду на більш екологічний матеріал з полімолочної кислоти.

Апробацію наукових результатів проведено через їх оприлюднення на IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультилінгвального глобалізованого світу», 11 квітня, 2024р., Київ (Додаток А).

Публікації:

1. **Makarenko M., Denysenko V.** LACTIC ACID BACTERIA IN THE FOOD INDUSTRY. IX Всеукраїнської науково-практичної конференції «Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультилінгвального глобалізованого світу» (11 квітня 2024р. Київ).

2. Луцій О.О., **Макаренко М.В.**, Морін В.В., Грецький І.О., Шидловська О.А. Дослідження можливостей використання дріжджів для синтезу наночасток металів. Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання: колективна монографія за 11 матеріалами Всеукраїнської наукової конференції / за ред. В. П. Плаван, А. О. Касич, О. О. Бутенко. Київ: КНУТД, 2024. 3 (Додаток Б).

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						9
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

Структура і обсяг роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 53 аркушах, складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Також є технологічна схема, яка накреслена на аркуші формату А1 (додається).

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						10
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

1.1. Характеристика молочної кислоти

Кінцевим продуктом виробництва, що проектується в даній роботі є молочна кислота харчова. Молочну кислоту також можна назвати 2-гідроксипропанова, 2-гідроксипропіонова та D/L – молочна кислота.

Емпірична формула: $C_3H_6O_3$ ($CH_3CHCOOH$).

Структурна формула молочної кислоти зображена на рис. 1.1 [1].



Рис. 1.1 Структурна формула молочної кислоти

Молярна маса – 90,08 г/моль

Фізичні властивості молочної кислоти:

Температура кипіння – 122°C при 2 кПа (15 мм рт.ст.)

Температура плавлення – 16,8°C

Константа дисоціації pKa - 4,14 при 22,58°C

Температура спалаху - >110°C

Розчинність – у воді = 1000000 мг/л. Змішується з етанолом (95%), ефіром і водою; практично нерозчинна у хлороформі.

В'язкість водного розчину молочної кислоти при 25 °C: 1,042 мПа*с (6,29 мас.%), 1,752 мПа*с (25,02 мас.%), 4,68 мПа*с (54,94 мас.%), 36,9 мПа*с (88,60 мас.%) [2].

					КР.ПЗ.162.08			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.						
Перевір.		Волошина І.М.						
Консультант						КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.								
Затверд.		Мокроусова О.Р.						

Молочна кислота чинить метаболічний олужнювальний ефект. Вона використовується в напоях, харчових продуктах, косметичі та фармацевтиці як підкислювач. В препаратах місцевого застосування, зокрема в косметичі, вона використовується для пом'якшувальної і кондиціонуючої дії на шкіру. Молочна кислота також може використовуватися у виробництві біорозкладних полімерів і мікросфер, таких як полі(D-молочна кислота), які використовуються для доставки ліків системи. Молочна кислота також використовується як харчовий консервант. Терапевтично, молочна кислота використовується в ін'єкціях, у формі лактату, як джерело бікарбонату для лікування метаболічного ацидозу; як сперміцидний агент; в песарії для лікування лейкореї; в дитячому харчуванні; і в препаратах місцевого застосування для лікування бородавок [3].

Молочну кислоту виготовляють такої концентрації: 40 %; 60 %; 80 %. Залежно від показників якості молочна кислота може бути таких сортів: – вищого (для 40 %); – першого (для 40 %, 60 %) [1].

1.2 Потреба у цільовому продукті

Харчова молочна кислота, вона ж харчова добавка E270 широко використовується в харчовій промисловості як консервант та регулятор кислотності. Наприклад, консервування овочів, виробництво сирів, йогуртів, кефіру, майонезів, кондитерських виробів, безалкогольних напоїв, консервів. Молочна кислота також використовується для отримання біополімерів, а саме полілактиду, біорозкладного полімеру, що використовується для 3Д-друку та виробництва біопластику.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						12
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

1.3 Розрахунок потужності виробництва

1.3.1 Розрахунок кількості молочної кислоти необхідної для виробництва достатньої кількості полілактиду

Встановлено, що вихід полілактиду становить 74% від маси використаної молочної кислоти [4].

Найчастіше пластиковим посудом користуються заклади швидкого харчування. До війни найбільш навантажений заклад МакДональдс що знаходиться на Вокзальній площі в Києві обслуговував приблизно 2млн на рік, але після війни показник впав на 30%, тому зараз ця цифра дорівнює 1,4 млн осіб. Встановлено, що середня вага упаковки для бургерів з полілактиду дорівнює 7,5 г. Приймаємо, що 1 людина використовує 1 упаковку за 1 відвідування.

$$N_{PLA/pik} = 7,5 * 1,4 = 10,5 \text{ (т)}$$

$$N_{LA/pik} = 10,5/0,74 = 14,2 \text{ (т)}$$

Таким чином для забезпечення 1,4 млн відвідувачів Мак Дональдса на вокзальній площі у Києві упаковками для бургерів з PLA на рік потрібно 14200 кг молочної кислоти.

1.3.2 Розрахунок потужності виробництва молочної кислоти *E. coli* WYZ–L

Відомо, що штам *E. coli* WYZ – L за 48 год. синтезує 97 г/л молочної кислоти [5].

Розраховуємо об'єм культуральної рідини необхідний для отримання 14200 кг молочної кислоти:

$$V_{к.р.0} = 14\,200\,000 \text{ г} / 97 \text{ г/л} = 146\,391 \text{ л}$$

Враховуючи можливі втрати цільового продукту (20%) розраховуємо необхідний об'єм культуральної рідини:

$$V_{к.р.} = 146\,391 \text{ л} / (1-0,2) = 182\,989 \text{ л}$$

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		13

1.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання необхідного об'єму культуральної рідини для забезпечення річної потреби в цільовому продукті та розрахунок об'єму ферментера.

Прийmemo кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) на рік 330. Враховуючи це розраховуємо кількість культуральної рідини на добу ($V_{д}$):

$$V_{д} = V_{кр} / T_{рд} = 189\,989 \text{ л} / 330 \approx 576 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість виробничих циклів на рік ($N_{ц}$):

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф}) / 24) = 189\,989 / (576 \times 54 / 24) = 147$$

Де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (огляд та мийка – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 48 год).

Розраховуємо об'єм культуральної рідини за один цикл:

$$V_{к.р./ц.} = K1 \times V_{д} \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 576 \times 78 / 24 \approx 2060 \text{ л}$$

де $K1$ – коефіцієнт можливих нестерильних операцій.

Розраховуємо об'єм ферментера необхідного для отримання 2059 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення ($K_{зап}$) 0,7:

$$V_p = V_{к.р./ц.} / K_{зап.} = 2069 / 0,7 \approx 3000 = 3 \text{ м}^3$$

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		14

РОЗДІЛ 2

ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

2.1.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

На сьогоднішній день промислове виробництво молочної кислоти біотехнологічним шляхом переважно здійснюють за допомогою зброджування цукру молочнокислими бактеріями.

Використовуючи генно-інженерні методи, створюються штами, які здатні накопичувати більші концентрації цільового продукту, та робити це швидше, аніж звичні продуценти. Але при виборі продуцента слід враховувати не лише швидкість синтезу та кінцеву концентрацію цільового продукту, а і вартість поживного середовища та інших специфічних витрат. Тому необхідно порівняти біологічні агенти задля виявлення найбільш економічно доцільного.

На першому етапі порівняння увага приділялась кінцевій концентрації цільового продукту, а саме молочної кислоти. В *табл.1.1* для кожного штаму наведено концентрації молочної кислоти в кінці біосинтезу, середня швидкість синтезу, склад поживного середовища та особливості проведення біосинтезу. На даному етапі порівняння штам *Bacillus subtilis* MUR1 показав найвищу продуктивність та концентрацію молочної кислоти, але він вимагає досить дорогого поживного середовища, що буде виявлено на другому етапі порівняння.

					КР.ПЗ.162.08			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.						
Перевір.		Волошина І.М.						
Консультант						КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.								
Затверд.		Мокроусова О.Р.				15		

Таблиця 2.1

Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Показники синтезу		Тривалість процесу, год	Особливості ТП	Використана література
		Концентрація продукту, г/л	Продуктивність, г/л/год			
<i>Bacillus subtilis</i> MUR1	Глюкоза – 170 Дріжджовий екстракт Ну Yest 444 – 75; KH ₂ PO ₄ – 1,5; K ₂ HPO ₄ – 1,5; MgCl ₂ – 0,03; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,08; Розчин мікроелементів – 2,3 мл/л	183,2	3,52	52	Температура - 37°C; pH – 7,5; Швидкість перемішування – 50 об/хв потік повітря – 3 vvm.	[6]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> N CIMB 8130	Сахароза - 89,9 Дріжджовий екстракт – 45,7 CaCO ₃ – 59,9	90	3,8	24	Температура - 45°C; pH – 7,5; Швидкість перемішування – 150 об/хв	[7]
<i>Rhizopus oryzae</i> NLX-M-1	Глюкоза - 50 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 3 MgSO ₄ 7H ₂ O - 0,75 ZnSO ₄ 7 H ₂ O - 0,20 KH ₂ PO ₄ - 0,30 CaCO ₃ - 10	60	0,6	96	32 °C, pH 5,5, аерація 0,5 vvm	[8]
<i>E. coli</i> WYZ - L	NBS цукор – 100 Бетаїн – HCL-0,02	97	1,83	48	37 °C, 200 об/хв, pH 7,0	[5]

КР.ПЗ.162.08

1	2	3	4	5
<i>Lacto-bacillus delbreckii</i> NCIMB 8130	Сахароза - 89,9	24	2,157	16
	Дріжджовий екстракт – 45,7	2000	150	2
	CaCO ₃ – 59,9	20	1,2	8
Вартість 1л - 153				
<i>Rhizopus oryzae</i> NLX-M-1	глюкоза - 50	40	2	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 3	20	0,06	17
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,75	17	1,275	6
	ZnSO ₄ 7 H ₂ O - 0,20	106	0,212	10
	KH ₂ PO ₄ - 0,30	101	0,303	3
	CaCO ₃ - 10	20	0,02	8
Вартість 1 л – 3,87				
<i>E. coli</i> WYZ - L	цукор - 100	24	2,4	16
	NBS (3,5 г KH ₂ PO ₄ ; 5,0 г HPO ₄ ; 3,5 г (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 0,25 г MgSO ₄ ·7H ₂ O, 15 мг CaCl ₂ · 2H ₂ O, 0,5 мг тіаміну, 1 мл розчину металу в слідах (1,6 г FeCl 3 /0,2 г CoCl ₂ ·6H ₂ O/0,1 г CuCl ₂ /0,2 г ZnCl ₂ ·4H ₂ O/0,2 г NaMoO ₄ /0,05 г H ₃ BO ₃))	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 24 CaCl ₂ · 2H ₂ O – 43,6 тіамін – 1650 FeCl ₃ – 50 CoCl ₂ ·6H ₂ O – 68 CuCl ₂ – 700 ZnCl ₂ ·4 H ₂ O – 109 NaMoO ₄ – 1600 H ₃ BO ₃ - 72	1,2435	18 19
	Бетаїн-HCl – 0,02	98	0,00002	
Вартість 1л – 3,64				

Примітки: Джерело*

1. https://prom.ua/ua/p1701217420-glyukoza-harchova.html?token=v2%3Axy_YMSmLT4iK0jasF9hiBFy1HS1H3x0ZVoK7WXJEqMsKXGZJnu76djWlMvh07OKmif36ggz12Vv3bcqPjSTgmHZ7um9aPLuHHZ0Dcp4xOm4YksdYvvnLxbeLY_lX_Vx&campaign_id=3792543&product_id=1701217420&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=80301&primelead=My42&from_spa=true

					КР.ПЗ.162.08		Аркуш_
							18
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата			

2. <https://www.fishersci.com/shop/products/hy-yest-412-30kg/NC1258195>

3. <https://megachem.com.ua/ua/kalij-fosfornokislyj-tehnicheskij.html>

4. <https://novohim.com.ua/ru/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/kalij-fosfornokislyj-2-zam/#:~:text=%D0%9A%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B9%20%D1%84%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%BE%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D1%8B%D0%B9%20%2D%D0%B7%D0%B0%D0%BC%D0%B5%D1%89%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B9%20%D1%8D%D1%82%D0%BE,%D0%BD%D0%BE%20%D0%BD%D0%B5%20%D1%80%D0%25B>

5. https://prom.ua/ua/p1130248250-magnij-hloristyj-bishofit.html?token=v2%3A5JxbkZNBsMMqcxMdoLbTbEcTYTd_wWWq0Pg0Rj1LVu7-qBi1ohCup0bi2N5qAjHJgBtmXYb9-2gcLtIGIQSU2xe49Kv2NLtBVlAJomQXBm_86KNSaw2d74bScptGggQ&campaign_id=1260300&product_id=1130248250&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=8020313&from_spa=true

6. <https://tovpaz.com/products/dobryva/mineralni/sulfat-magniyu-kristalichniy-mgso4-mishok-25-kg>

7. <https://soda.kiev.ua/ua/p39521787-oksid-magniya.html>

8. https://prom.ua/ua/p1098533283-karbonat-kaltsiya-tonkodispersnyj.html?token=v2%3AyNu34WAQD5bmLRX0oxhJG4A6eTvsqdTIApBF_q1dLJMVcVF5eKgrzMipIw0dPrMHLzjKyu-ZXkOt86veCIqSjtm1QmK-WbaIZbw_8vk6LSAlaG0mmxK0zXei0d9FVJ&campaign_id=3455099&product_id=1098533283&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=8020313&from_spa=true

9. <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>

10. <https://agrolavka.com.ua/ua/p2000666874-sulfat-tsinka-meshok.html>

11. <https://himfarminvest.com.ua/margantsa-sulfat>

12. <https://soda.kiev.ua/ua/p23599407-sulfat-medi-korm.html>

13. <https://himfarminvest.com.ua/sulfat-kobalta>

14. <https://soda.kiev.ua/ua/p39207874-bornaya-kislota.html>

15. <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/solyana-kislota-hch-IDWqyNo.html>

16. <https://soda.kiev.ua/ua/p19424937-caharoza-chda.html>

17. <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p740948461-sulfat-ammoniya-ammoniumsulphate.html>

18. <https://megachem.com.ua/diammonijfosfat-v-bb-1000-kg-rossiya-ukraina.html>

19. https://prom.ua/ua/p1296604649-kaltsij-hloristyj.html?token=v2%3AHe_Eqv0AdjRvztKFZfjeus5Uu29-T8Y3D7zdVm07DAv0odrYy8wMTPWF7IwOgKxgdRxw5BrRCElTVnjveocumBiQbfmDMWI3OgkMgChO_yo7oJwVCXp0s5gvnJ_S3A2N&campaign_id=1260300&product_id=1296604649&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=8020313&from_spa=true

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						19
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

**Порівняльна таблиця умовної вартості 1 г молочної кислоти при
культивуванні обраними продуцентами**

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація синтезованої за 1 год, г/л молочної кислоти	Умовна вартість 1 г молочної кислоти, грн	Тривалість культивува ння	Концентрація молочної кислоти, г/л
<i>Bacillus subtilis</i> MUR1	157,2	3,52	0,86	52	183,2
<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i> NCIMB 8130	153	3,8	1,7	24	90
<i>Rhizopus oryzae</i> NLX-M-1	3,87	0,6	0,06	96	60
<i>E. coli</i> WYZ - L	3,64	1,83	0,037	48	97

Другий етап полягає в розрахунку та порівнянні вартості поживних середовищ. На даному етапі порівняння було виявлено, що штам *E. coli* WYZ–L має найнижчу вартість поживного середовища порівняно з іншими (табл. 1.2).

На останньому, третьому етапі, де порівнювалась умовна вартість 1 г молочної кислоти синтезованої даними продуцентами (табл. 1.3), найбільш економічно доцільним виявився штам *E. coli* WYZ–L.

Проаналізувавши дані з таблиць 1.1, 1.2, 1.3, доходимо до висновку, що біосинтез молочної кислоти за допомогою штаму *E. coli* WYZ – L є найбільш вигідним з економічної точки зору. Тому у подальшому будемо отримувати молочну кислоту саме за допомогою *E. coli* WYZ – L.

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера

Вибір ферментера залежить від умов біосинтезу молочної кислоти бактеріями *E. coli* WYZ – L. Дані умови залежать від морфологічно-культуральних властивостей продуценту та фізико-хімічних властивостей цільового продукту.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						20
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

Вирощування продуценту відбувається за температури 37°C , 150 об/хв та рН 7,0. Промисловий біосинтез відбувається за такої ж температури 37°C, 200 об/хв та рН 7,0 [5]. Оскільки наш штам являється аеробом, то культивування потребує подачі стерильного повітря за допомогою барботера та рівномірного розподілення його в культуральній рідині за допомогою турбінних перемішувачів.

Враховуючи те, що за потрібних нашому продуценту умов культивування також розвиваються й більшість інших мікроорганізмів, необхідно забезпечити стерильні умови виробництва задля запобігання контамінацій. Для цього проводять заходи по стерилізації обладнання, комунікацій та поживного середовища.

У випадку біосинтезу молочної кислоти бактерією *E. coli* WYZ-L спосіб культивування та виробництва є глибинним та періодичним.

Отже, ферментер має бути оснащеним: дозатором для підлужувального розчину; датчиками рН, температури та розчиненого кисню; барботером; мішалкою; сорочкою.

Ферментер який підходить нашим вимогам можна замовити у компанії «IndiaMART» (Індія) (рис. 2.1). Даний ферментер виготовлений з високоякісної сталі. Він оснащений всіма необхідними датчиками, а саме рН, температури, розчиненого кисню та рівня піни. Має автоматизовану систему стерилізації.

2.2.2 Вибір миючих та дезінфікуючих засобів.

Задля запобігання адаптації контамінантів до дезінфікуючих засобів було обрано два дезінфікуючих засоби з різними діючими речовинами.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						21
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		



Рис. 2.1 Біореактор Insitu Fermenter на 3000 л «IndiaMART» (Індія)

2.2.3.1 Обґрунтування вибору миючого засобу

Біомой, порошкоподібний мийний засіб з дезінфікуючим ефектом. Відмінно підходить для достерилізаційного очищення виробів медичного призначення із металу, скла, гуми та полімерних матеріалів. Він має відносно низьку ціну (280 грн за кг), має відносно невисокі робочі концентрації (0,15%,0,3%,0,5%) та фасується в мішки по 20 кг, що задовольняє виробничі потреби. Біомой підходить як для миття внутрішніх комунікацій обладнання так і для миття приміщень [9].

Склад засобу: вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0-8,0; лужна протеаза 1,0-1,1 (діючі речовини); натрію карбонат; диспергатор; наповнювач.

Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу: Сипкий порошок від білого до світло жовтого кольору. Допускається наявність грудочок, які подрібнюються при натисканні, та забарвлених включень ензимів. Має характерний запах використаної сировини. Концентрація водневих іонів (рН) розчину з масовою часткою 1 % 9,0-11,5 од. рН. Добре розчиняється у воді.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						22
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

Водні розчини Біомою прозорі, безбарвні, не кородують вироби медичного призначення із металу, скла, полімерних матеріалів, гуми та комбінованих матеріалів. Засіб не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами.

Специфічні властивості засобу: Біомой виявляє змочувальні, мийні, емульгуючі властивості, видаляє білкові, жирові забруднення, залишки крові, лікарських та дезінфекційних засобів із зовнішніх поверхонь і поверхонь внутрішніх каналів виробів медичного призначення, легко змивається з оброблених виробів, не залишає нальоту.

Токсичність та безпечність засобу: Біомой, належить до помірно небезпечних речовин при введенні у шлунок (3 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). Не виявляє шкірно-резорбтивних, шкірно-подразнювальних та сенсibiliзуючих властивостей. У нативній формі (порошок) спричиняє подразнення слизової оболонки очей та верхніх дихальних шляхів. У рекомендованих до застосування концентраціях не подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Не виявляє мутагенних, канцерогенних та ембріотоксичних властивостей (за діючою речовиною). Використання робочих розчинів Біомою для ручного та механізованого достерилізаційного очищення виробів медичного призначення, враховуючи відсутність у його складі летких компонентів, не становить загрози надходження компонентів засобу у повітря робочої зони.

Методика та умови приготування робочих розчинів: Робочі розчини Біомою готують у промаркованій тарі, що виготовлена із будь-яких матеріалів, шляхом розчинення у воді. Для приготування робочих розчинів засобу використовують воду питну згідно з ДСанПіН 2.2.4-171. Розчин готують у трьох робочих концентраціях 0,15%, 0,3%, 0,5%.

Термін та умови зберігання робочого розчину: Робочий розчин Біомою використовують протягом доби після виготовлення за умов зберігання його кольору. Допускається зберігати невикористаний робочий розчин протягом 14 діб за умов зберігання у тарі зі щільно закритою кришкою. Робочі розчини

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						23
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

Біомою із терміном зберігання більше, ніж 14 діб, придатні для миття поверхонь приміщень, підлоги, предметів догляду за хворими, предметів інтер'єру тощо [10].

2.2.3.2 Дезінфекційні засоби

Перший дезінфекційний засіб – **Blanidas-A Forte**

Blanidas-A Forte Дезінфікуючий засіб на основі 15%-ї надоцтової кислоти. Він має відносно невисоку ціну (150 грн за 1л) та випускається в 20 л ємностях, що задовольнить виробничі потреби.

Blanidas-A Forte являє собою стабілізований 15% розчин надоцтової кислоти, що не піниться і легко змивається. Високо ефективний при видаленні будь-яких типів мікроорганізмів включаючи бактерії, дріжджі, грибок, спори і віруси.

Переваги:

- сильно концентрований продукт - економічний у використанні;
- ефективний дезінфікуючий засіб, широко застосовується для СІР-мийки в харчовій, пивоварній, молочній промисловості, а також на виробництві безалкогольних напоїв;
- завдяки сильному окислюючому ефекту добре видаляє плями; - легко змивається, не залишаючи розводів;
- безпечно для навколишнього середовища;
- ефективно працює в жорсткій воді.

Інструкція по застосуванню: Засіб Blanidas-A Forte використовується в концентрації 0,04-2% по масі (0,03-1.8% по об'єму, від 3 до 18мл) в залежності від типу і ступеня забруднення. Температура застосування робочого розчину від холодної до 90°C.

Вплив на поверхні: Засіб Blanidas-A Forte може застосовуватися на всіх типах нержавіючої сталі, використовуваної при виготовленні обладнання для харчової промисловості, при дотриманні рекомендованої концентрації і температури. Засіб несумісний з м'якими металами, міддю та алюмінієм.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						24
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

Необхідно завжди ретельно ополіскувати поверхню, але не пізніше, ніж через годину після обробки.

Інформація по зберіганню: Зберігати в закритій оригінальній упаковці, берегти від джерел тепла [11].

Другий дезінфікуючий засіб – Віндез ЧАС-С.

Антимікробна складова: 6,1% четвертинної амонієвої сполуки, 5% спирту.

Властивості: водні розчини засобу прозорі, від майже безбарвних до світло-блакитного кольору, майже не мають запаху, стійкі; забезпечують ефективну дезінфекцію широкого спектра об'єктів; мають пролонговану антимікробну дію, відмінні змочувальні та миючі властивості, усувають неприємні запахи; не пошкоджують об'єкти обробки з матеріалів, стійких до дії низькоконцентрованих спиртових розчинів; не фіксують органічні та неорганічні забруднення на об'єктах обробки; добре змиваються, не залишають плям і нальоту;

Переваги:

Широкий спектр антимікробної дії:

- бактерії (у т.ч. мікобактерії туберкульозу, кишкова та синьогнойна палички);
- віруси (у т.ч. віруси гепатитів, ВІЛ-інфекції, коронавірусної інфекції, грипу, «пташиного грипу», «свинячого грипу», SARS);
- грибки (збудники кандидозів, дерматомікозів, трихофітій);
- плісняві гриби та спори;
- збудники внутрішньолікарняних інфекцій;
- збудники анаеробних інфекцій;
- збудники особливо небезпечних інфекцій.

Властивості засобу при приготуванні робочих розчинів:

- добре розчиняється у воді в будь-яких співвідношеннях;
- не потребує підігріву води та додавання допоміжних речовин;
- не має обмежень щодо матеріалу ємностей для приготування розчинів.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						25
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

Властивості робочих розчинів засобу:

- мають пролонговану антимікробну дію;
- мають відмінні змочувальні та миючі властивості, усувають неприємні запахи;
- видаляють білкові, жирові, механічні забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів і порожнин медичних виробів;
- не викликають корозії металів, не пошкоджують об'єкти з різних матеріалів, стійких до дії низькоконцентрованих спиртових розчинів;
- не фіксують білкові та інші органічні та неорганічні забруднення на поверхнях об'єктів обробки, у т.ч. медичних виробів;
- добре змиваються мінімальною кількістю води;
- не залишають слідів (плям, патьоків, розводів, нальоту);
- гомогенізують мокротиння та інші виділення.

Токсичність та безпечність засобу:

- належить до помірно небезпечних речовин при введенні в шлунок;
- належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру;
- належить до мало небезпечних речовин в умовах інгаляційної дії у вигляді пари;
- не має віддалених наслідків для здоров'я.

Економічність засобу:

- висока ефективність при низьких нормах витрати;
- скорочений час експозиції (5 хвилин) для дезінфекції різних об'єктів при інфекціях більшості етіологій (бактерії, туберкульоз, грибки), а також для дезінфекції високого рівня та стерилізації (15 хвилин);
- ефективність одноразової обробки поверхонь методом протирання або зрошення при нормі витрати робочого розчину не більше 100 мл/м²;
- ефективність одноразової обробки поверхонь методом «двох відер» або методом «безвідерного прибирання» при нормі витрати робочого розчину 15 мл/м²;

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						26
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

- ефективність одноразової обробки приміщень, ємнісного обладнання тощо аерозольним методом при нормі витрати робочого розчину 10-20 мл/м³. [12]

Методика та умови приготування робочих розчинів:

«Віндез ЧАС-С» готують у спеціально виділених промаркованих ємностях шляхом розчинення необхідної кількості засобу у воді. При приготуванні робочих розчинів засіб «Віндез ЧАС-С» добре розчиняється у воді в будь-яких співвідношеннях, не потребує її підігріву, додавання допоміжних речовин, додаткового посилення або попередньої активації, відсутні обмеження щодо матеріалу ємностей для приготування розчинів.

Розчин має такі робочі концентрації: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0.

Строк придатності та умови зберігання робочих розчинів: 5 років від дати виготовлення. Строк придатності робочих розчинів засобу «Віндез ЧАС-С» до застосування – 15 діб за умови зберігання в закритих ємностях у затемненому місці [12].

2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації

2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримують 2060 л культуральної рідини ($V_{кр}$).

Кількість посівного матеріалу разом з поживним середовищем з урахуванням втрат середовища (10%) становитиме:

$$V_{p.1} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 2060 / (1 - 0,1) = 2290 \text{ л}$$

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

Робочий об'єм ферментера в якому відбувається виробничий біосинтез становить 2890 л.

Враховуючи вибраний коефіцієнт заповнення 0,7 теоретичний об'єм ферментера становитиме $V_{\phi.1} = 2290 / 0,7 = 3271$ л. Найбільш влаштовуючий за

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						27
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

об'ємом стандартний ферментер має об'єм 3000 л ($V_{с.ф1}$), тоді уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.} = V_{р.1} / V_{с.ф1} = 2290 / 3000 = 0,76$$

Об'єм посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді розрахуємо об'єм поживного середовища:

$$V_{п.с.1} = V_{р.1} / (1 + X_{п.м.}) = 2290 / (1 + 0,1) = 2082 \text{ л}$$

Де $X_{п.м.}$ – частка посівного матеріалу.

Тоді кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{п.м.1} = V_{р.1} - V_{п.с.1} = 2290 - 2082 = 208 \text{ л}$$

2.3.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 300 л

Для отримання 208 л посівного матеріалу об'єм посівного матеріалу та поживного середовища з урахуванням втрат (10%) становитиме:

$$V_{р.2} = V_{п.м.1} / (1 - E_{ін.}) = 208 / (1 - 0,1) = 231 \text{ л}$$

Теоретичний об'єм інокулятора становитиме $V_{ін.} = 231 / 0,7 = 330 \text{ л}$. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер має об'єм 300 л ($V_{с.ф.2}$).

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = V_{р.2} / V_{с.ф2} = 231 / 300 = 0,77$$

Розрахуємо об'єм поживного середовища в інокуляторі:

$$V_{п.с.2} = V_{р.2} / (1 + X_{ін.}) = 231 / (1 + 0,1) = 210$$

Тоді об'єм посівного матеріалу для інокулятора становитиме:

$$V_{п.м.2} = V_{р.2} - V_{п.с.2} = 231 - 210 = 21 \text{ л}$$

2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л

Для отримання 21 л посівного матеріалу об'єм посівного матеріалу та поживного середовища з урахуванням втрат (10%) становитиме:

$$V_{р.3} = V_{п.м.2} / (1 - E_{ін.}) = 21 / (1 - 0,1) = 23 \text{ л}$$

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						28
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

Теоретичний об'єм інокулятора становитиме $V_{\text{ін}}=23/0,7=33$ л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер має об'єм $V_{\text{с.ф.3}}=30$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = V_{\text{р.3}}/V_{\text{с.ф.3}} = 23/30 = 0,77$$

Розрахуємо об'єм поживного середовища в інокуляторі:

$$V_{\text{п.с.3}} = V_{\text{р.3}}/1 + X_{\text{ін}} = 23/1 + 0,1 = 21$$

Тоді об'єм посівного матеріалу для інокулятора становитиме:

$$V_{\text{п.м.3}} = V_{\text{р.3}} - V_{\text{п.с.3}} = 23 - 21 = 2 \text{ л}$$

2.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в струшувальних колбах

Для отримання 2 л посівного матеріалу використовують струшувальні колби об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап.}} = 0,2$. Розрахуємо кількість колб:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{п.м.3}}/V_{\text{колю}} \times K_{\text{зап.}} = 2000/750 \times 0,2 = 14$$

Для отримання 2 л посівного матеріалу потрібно 14 струшувальних колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення біосинтезу молочної кислоти в ферментері об'ємом 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити в три етапи.

2.3.5 Параметри стерилізації компонентів поживного середовища

Підготовка посівного матеріалу та біосинтез молочної кислоти відбувається в поживному середовищі такого складу (г/л):

Сахароза – 100, KH_2PO_4 – 3,5, K_2HPO_4 – 5,0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 3,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,015, Тіамін – 0,0005, FeCl_3 – 0,0016, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0,0002, CuCl_2 – 0,0001, $\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0,0002, NaMoO_4 – 0,0002, H_3BO_3 – 0,00005, Бетаїн – 0,02

2.3.5.1 Вирощування посівного матеріалу в колбах

В залежності від умов стерилізації та концентрації компонентів ділимо поживне середовище на такі композиції:

Композиція 1: розчин сахарози – умови стерилізації: 112°C, 30 хв

Композиція 2: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Композиція 3: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Композиція 4: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CuCl_2 , $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, бетаїн, тіамін- HCl , H_3BO_3 , NaMoO_4 – умови стерилізації: 112°C, 30 хв.

Солі композицій 2 та 3 стерилізуються окремо задля запобігання утворення нерозчинних солей. Компоненти композиції 4 готуються як запасній розчин так як додаються до поживного середовища в малій концентрації. Сахароза та тіамін є термолабільними речовинами тому для них був обраний пом'якшений режим стерилізації.

2.3.5.2 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Композиція 1: розчин сахарози – умови стерилізації: 112°C, 30 хв

Композиція 2: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Композиція 3: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Композиція 1 готується та стерилізується в інокуляторі об'ємом 30 л. Композиції 2 та 3 готуються та стерилізуються в колбах об'ємом 2 літри. Композиція 4 додається з уже готового запасного розчину.

2.3.5.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л

Композиція 1: розчин сахарози – умови стерилізації: 112°C, 30 хв

Композиція 2: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Композиція 3: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Композиція 1 готується та стерилізується в інокуляторі об'ємом 300 л. Композиція 2 готується та стерилізується в збірнику об'ємом 6 л. Композиція 3

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						30
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

готується та стерилізується в колбі об'ємом 2 л. Композиція 4 додається з уже готового запасного розчину.

На даній стадії ля приготування композиції 2 передбачено встановлення збірника об'ємом 6 л оснащеним теплообмінником та збірника об'ємом 10 л для 6 % - го розчину NaOH

2.3.5.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 м³

Композиція 1: розчин сахарози – умови стерилізації: 112°C, 30 хв

Композиція 2: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Композиція 3: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, тіамін-HCl, FeCl_3 , CoCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , NaMoO_4 , H_3BO_3 , CaCl_2 , бетаїн - HCl – умови стерилізації: 130°C, 40 хв

Для даної стадії склад композиції 3 перескладається. Композиція 1 готується та стерилізується у ферментері в якому буде проводитись виробничий біосинтез. Композиція 2 готується та стерилізується в збірнику об'ємом 100 л. Композиція 3 готується та стерилізується в збірнику об'ємом 10 л.

Для даної стадії передбачено встановлення збірника об'ємом 100 л для 6 % - го розчину NaOH та збірників для композиції 2 та 3 об'ємами 100 та 10 л відповідно, їх оснащують теплообмінниками.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						31
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

Домен: Bacteria

Тип: Proteobacteria

Клас: Gamma-Proteobacteria

Порядок: *Enterobacterales*

Родина: *Enterobacteriaceae*

Рід: *Escherichia*

Вид: *Escherichia coli*

Штам: *Escherichia coli* WYZ-L

3.2 Морфолого-культуральні властивості

E. coli мають вигляд палички із заокругленими кінцями, поліморфні, розміром 1,1–1,5×2,0–6,0 мкм. Більшість штамів мають капсулу або мікрокапсулу, рухливі, але трапляються і нерухливі штами, спор не утворюють, грамнегативні.

Невибагливі до поживних середовищ, легко ростуть на МПА і МПБ. На щільних середовищах бактерії утворюють плоскі опуклі каламутні S-колонії з рівними або трошки хвилястими краями (3–5 мм у діаметрі) або сухі плоскі R-колонії з нерівними краями. У рідких середовищах ростуть дифузно, викликаючи помутніння середовища і утворення осаду (рідше формують поверхневу плівку або пристінкове кільце)[13].

					КР.ПЗ.162.08			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.						
Перевір.		Волошина І.М.						
Консультант						КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.								
Затверд.		Мокроусова О.Р.						

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

E. coli є факультативним анаеробом. За типом живлення є хемоорганогетеротрофом. *E. coli* розщеплює лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу, арабінозу та ін. цукри.

Бактерія є мезофілом, тобто здатна рости в температурних межах 20°C-40°C. Оптимальними умовами росту є 37°C та pH 6,8-7,2 [14].

3.4 Отримання штаму *E. coli* WYZ – L

Штам, що продукує D-молочну кислоту, *E. coli* HBUT-D, був реконструйований для продукції L-молочної кислоти шляхом заміни гена D-лактатдегідрогенази (*ldhA*) на L-лактат ген дегідрогенази (*ldhL*) з *Pedicoccus acidilactici*, з подальшою адаптивною еволюцією для зброджування сахарози. Отриманий штам, *E. coli* WYZ-L, має посилену експресію оперону сахарози (*cscA* та *cscKB*) [5].

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						33
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема отримання молочної кислоти штамом *E. coli* WYZ-L складається з допоміжних робіт, технологічного процесу, відвантаження та знешкодження відходів.

Технологічну схему отримання молочної кислоти наведено у графічній частині на аркуші формату A1 (додається)

Д.Р.1 Санітарна підготовка виробництва

ДР. 1.1 Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання та перевірка знань персоналу

Персонал навчають основам санітарії та принципам GMP. Проводять інструктаж з техніки безпеки. Проводять контроль знань.

ДР 1.1.2 Медичний огляд

Проводять огляд персоналу, контролюють наявність санітарної книжки.

ДР 1.1.3 Підготовка одягу

Проводять прання при 60-80°C протягом 30 хв та прасування одягу після чого видають чистий персоналу.

ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

ДР 1.2.1 Підготовка миючих засобів

Готують розчин миючого засобу «Біомой» концентрацією 0,15% - 0,5 % (температура води для розведення кімнатна), потрібну кількість та розливають по промаркованим 5 л каністрам

ДР 1.2.2 Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

В дозатори перед входом в цех заливають 70 % спирт

					КР.ПЗ.162.08			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.						
Перевір.		Волошина І.М.						
Консультант						КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.								
Затверд.		Мокроусова О.Р.						
								34

ДР 1.2.3 Підготовка дезінфікуючих засобів для приміщень та обладнання

Готують потрібну концентрацію (0,03%-1,8%) засобу Blanidas – А – Forte (температура води для розведення кімнатна) та розливають по промаркованим 5 л каністрам. Готують потрібну концентрацію засобу Віндез ЧАС-С (0,05%-5%) (температура води для розведення кімнатна) та розливають по промаркованим 5 л каністрам.

ДР 1.3 Підготовка приміщень

ДР 1.3.1 Генеральне прибирання

Проводиться один раз в тиждень чергуючи дезінфікуючі засоби раз на місяць. Використовуючи 0,5 % розчин миючого засобу «Біомой» (від ДР 1.2.1) здійснюють ретельне миття приміщень та обладнання. Після цього проводиться обробка дезінфекційним засобом «Blanidas–А–Forte» концентрацією 1,8% або 5% розчином «Віндез ЧАС-С» (від ДР 1.2.3)

ДР 1.3.2 Щоденне прибирання

Використовуючи 0,15 % розчин миючого засобу «Біомой» (від ДР 1.2.1) здійснюють ретельне миття приміщень та обладнання. Після цього проводиться обробка дезінфекційним засобом «Blanidas–А–Forte» концентрацією 0,03% або 0,05% розчином «Віндез ЧАС-С» (від ДР 1.2.3).

ДР 1.4 Підготовка обладнання

ДР 1.4.1 Миття

В ручному режимі за допомогою пристрою для мийки високого тиску, використовуючи питну воду, видаляють всі видимі забруднення. Після цього на зовнішні частини застосовують миючий засіб «Біомой»(0,3%) та дезінфікуючий «Blanidas-A-Forte»(1,8%) (від ДР 1.2.1 та ДР 1.2.3).

ДР 1.4.2 Технічний огляд

Проводять візуальний огляд обладнання та його частин та при вияві несправностей ліквідують їх по можливості.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						35
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 1.4.3 Дезінфекція, ополіскування

Здійснюють дезінфекцію зовнішніх поверхонь обладнання. Цим же розчином змочують килимки при вході в усі приміщення. Ополіскування проводять очищеною або пом'якшеною водою, з передачею води в збірник нейтралізації. Останнім етапом є 5 хвилинне ополіскування очищеною водою.

ДР 1.4.4 Перевірка на герметичність

У ферментер подають стерильне повітря і встановлюють тиск $P = 0,15-0,2$ МПа, витримують 1 годину, після чого відмічають наявність падіння тиску. У разі падіння тиску більше 0,005 МПа апарат вважається не герметичним, після чого проводять пошук нещільностей. Пошук здійснюється методом омилування усіх місць з'єднань господарським милом.

ДР 1.4.5 Стерилізація

Стерилізацію проводять за допомогою гострої пари за температури 120°C , за тиску 0,2 МПа протягом 1,5 годин з подальшим охолодженням протягом 3,5 год. Перед обробкою парою з ферментера видаляють осад. Пара подається в середину апарату, сорочку обладнання та прилеглі комунікації.

ДР 2 Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

За допомогою повітрозабірника здійснюється забір повітря на висоті 30 м від найвищої точки будівлі. Висота будівлі 10 м.

ДР 2.2 Очищення повітря від механічних часток

За допомогою фільтра грубої очистки з повітря видаляються завислі часточки, та досягається ступінь очищення 80 %

ДР 2.3 Стиснення повітря

За допомогою компресора при тиску 0,35 МПа відбувається стиснення повітря внаслідок чого його температура підвищується до 120 – 200

ДР 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи

За допомогою теплообмінника повітря охолоджується до $25-30^{\circ}\text{C}$ внаслідок чого його вологість зменшується до 60%. Конденсат видаляється за допомогою ресивера.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						36
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 2.5 Стабілізація термодинамічних показників повітря

За допомогою теплообмінника повітря нагрівають до 50°C, після чого його вологість зменшується до 50%

ДР 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі

За допомогою головного фільтра повітря досягає 95% ступеня очищення.

ДР 2.7 Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Завершальний етап відбувається в індивідуальному фільтрі де повітря досягає 99,99 % ступеня очистки.

ДР 3 Приготування розчинів для регулювання рН

ДР 3.1 Приготування 6% - го розчину NaOH

ДР 3.1.1 Приготування 6% - го розчину NaOH для інокулятора 30 л

Готують 500 мл розчину для автоматичної регуляції рН. На технічних вагах зважують 30 г кристалічного NaOH, наважку переносять в колбу об'ємом 1 л та додають 470 мл питної води і перемішують. Закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 130°C протягом 40 хв.

ДР 3.1.2. Приготування 6% - го розчину NaOH для інокулятора 300 л

Готують 5 л розчину для автоматичної регуляції рН. За допомогою об'ємно – вагового дозатора в збірник об'ємом 10 л вносять 300 г кристалічного NaOH та 4,7 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин стерилізують гострою парою при 130°C протягом 40 хв.

ДР 3.1.3. Приготування 6% - го розчину NaOH для ферментера 3м³

Готують 50 л розчину для автоматичної регуляції рН. За допомогою об'ємно – вагового дозатора в збірник об'ємом 100 л вносять 3 кг кристалічного NaOH та 4,7 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин стерилізують гострою парою при 130°C протягом 40 хв.

ДР 4 Приготування та стерилізація підживлюючих розчинів

ДР 4.1 Приготування та стерилізація запасного розчину CaCl₂, металів в слідах, тіаміну-HCl та бетаїну - HCl.

На аналітичних вагах зважують 0,5 г тіаміну-HCl, 1,6 г FeCl₃, 0,2 г CoCl₂, 0,1 г CuCl₂, 0,2 г ZnCl₂, 0,2 NaMoO₄, 0,05 г H₃BO₃, на електронних вагах

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						37
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

зважують 20 г бетаїну - HCl та 15 г CaCl₂. У колбу об'ємом 2 л вносять наважки та доводять об'єм розчину до 1 л дистильованою водою. Закупорюють колбу пробкою та стерилізують при 112°C протягом 30 хв.

ДР 5 Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в струшувальних колбах

В струшувальних колбах необхідно підготувати 2 л поживного середовища.

Розрахунок компонентів наведено в *табл. 4.1*

Таблиця 4.1

Розрахунок кількості компонентів на 2 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2 л середовища, г	Композ иція	Об'єм композиції, мл	Об'єм ємності, мл
Сахароза	100	200	1	1 000	3 000
Вода		1 000			
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,5	7	2	800	2 000
K ₂ HPO ₄	5,0	10			
KH ₂ PO ₄	3,5	7			
Вода		800			
MgSO ₄	0,25	0,5	3	200	500
Вода		200			

Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 200 г сахарози, потім наважку вносять у колбу об'ємом 3 л та додають 800 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення компоненту. Колбу закупорюють ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 112°C протягом 30 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах відважують 3,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5 г K_2HPO_4 , 3,5 г KH_2PO_4 , вносять в колбу об'ємом 2 л та додають 800 мл дистильованої води температурою 40°C, перемішують до повного розчинення солей. Колбу закупорюють ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 130°C протягом 40 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 3

На аналітичних вагах відважують 250 мг MgSO_4 , вносять в колбу об'ємом 1 л та додають 400 мл питної води температурою 40°C, перемішують до повного розчинення солі. Колбу закупорюють ватно – марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 130°C протягом 40 хв.

ДР 5.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в інокуляторі 30 л

В інокуляторі об'ємом 40 л необхідно приготувати 23 літри інокуляту враховуючи те, що для цього об'єм посівного матеріалу становитиме 2 л, кількість води для приготування поживного середовища становитиме 21 л.

Розрахунок компонентів на 21 л середовища наведено в *табл 4.2*

Таблиця 4.2

Розрахунок компонентів на 21 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 21 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	100	2,1	1	17 500
Вода		17,5		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,5	0,0735	2	1 500
K_2HPO_4	5,0	0,105		
KH_2PO_4	3,5	0,0735		
Вода		1,500		
MgSO_4	0,25	0,00525	3	1 000
Вода		1		

Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 2100 г сахарози, наважку поміщають в інокулятор та додають 17,5 л питної води, перемішують при 150 об/хв до розчинення речовини. Стерилізують при 112°C протягом 30 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах зважують 73,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 105 г K_2HPO_4 , 73,5 г KH_2PO_4 , наважки переносять в колбу об'ємом 2 л, додають 1,5 л питної води температурою 40°C та перемішують до повного розчинення солей. Стерилізують в автоклаві при 130°C протягом 40 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 3

На електронних вагах зважують 5,25 MgSO_4 , наважку переносять в колбу об'ємом 2 л та додають 1 л питної води температурою 40°C, перемішують до розчинення солі. Стерилізують в автоклаві при 130°C протягом 40 хв.

ДР 5.3 Приготування та стерилізація середовища для вирощування в інокуляторі 300 л

В інокуляторі об'ємом 300 л необхідно приготувати 231 літр інокуляту враховуючи те, що для цього об'єм посівного матеріалу становитиме 21 л, кількість води для приготування поживного середовища становитиме 210 л.

Розрахунок компонентів на 210 л середовища наведено в *табл. 4.3*

Таблиця 4.3

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 210 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	100	21	1	205
Вода		205		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,5	0,735	2	4
K_2HPO_4	5,0	1,05		
KH_2PO_4	3,5	0,735		
Вода		4		
MgSO_4	0,25	0,0525	3	1
Вода		1		

Підготовка та стерилізація композиції 1

За допомогою об'ємно – вагового дозатора в інокулятор вносять 21 кг сахарози та додають 205 л питної води, перемішують при 150 об/хв до розчинення речовини. Стерилізують при 112°C протягом 30 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах зважують 735 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1050 г K_2HPO_4 , 735 г KH_2PO_4 , наважки переносять у реактор об'ємом 6 л, додають 4 л питної води, за допомогою теплообмінника підігрівують до 40°C для кращого розчинення та перемішують при 150 об/хв до розчинення солей. Стерилізують при 130°C протягом 40 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 3

На технічних вагах зважують 52,5 MgSO_4 , наважку переносять в колбу об'ємом 2 л та додають 1 л питної води температурою 40°C, перемішують до розчинення солі. Стерилізують в автоклаві при 130°C протягом 40 хв.

5.4 Приготування та стерилізація середовища для вирощування в ферментері 3 м³

В інокуляторі об'ємом 3000 л необхідно приготувати 2290 літрів культуральної рідини, враховуючи те що 10% становить інокулят, потрібно приготувати та простерилізувати 2080 літрів поживного середовища

Розрахунок компонентів на 2080 л середовища наведено в *табл. 4.4*

Таблиця 4.4

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2080 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	100	208	1	2025
Вода		2025		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,5	7,280	2	50
K_2HPO_4	5,0	10,400		
KH_2PO_4	3,5	7,280		
Вода		50		

MgSO ₄	0,25	0,520	3	5
CaCl ₂	0,015	0,0312		
Тіамін – HCl	0,0005	0,00104		
FeCl ₃	0,0016	0,0033		
CoCl ₂	0,0002	0,0004		
CuCl ₂	0,0001	0,0002		
ZnCl ₂	0,0002	0,0004		
NaMO ₄	0,0002	0,0004		
H ₃ BO ₃	0,00005	0,0001		
Бетаїн - HCl	0,02	0,0416		
Вода		5		

Підготовка та стерилізація композиції 1

За допомогою об'ємно – вагового дозатора в ферментер вносять 208 кг сахарози та додають 2025 л питної води, перемішують при 150 об/хв до розчинення речовини. Стерилізують при 112°C протягом 30 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 2

За допомогою об'ємно – вагового дозатора в реактор об'ємом 100 л додають 7 280 г (NH₄)₂HPO₄, 10400 г K₂HPO₄, 7 280 г KH₂PO₄ та 50 л питної води. Перемішують при 150 об/хв до повного розчинення компонентів. Стерилізують при 130°C протягом 40 хв.

Підготовка та стерилізація композиції 3

В реактор об'ємом 10 л вносять наважки компонентів композиції 3, розрахунок якої наведено в *табл. 4.4* та 5 л питної води. Перемішують при 150 об/хв до повного розчинення компонентів. Стерилізують при 112°C протягом 30 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1 Підтримання музейної культури

Музейну культуру *E. coli* WYZ – L зберігають на скошеному твердому середовищі Лурія – Бертані (LB) при 4°C. Культуру пересівають кожні 4 місяці.

ТП 6.2 Отримання ізолюваних колоній робочої культури

Для отримання ізолюваних колоній *E. coli* WYZ – L музейну культуру пересівають на чашки Петрі із середовищем NBS з 2% сахарози. Чашки засіяні музейною культурою інкубують в термостаті при 37°C протягом 15 годин.

ТП 6.3 Отримання робочої культури

Ізолювані колонії за допомогою мікробіологічної петлі переносять у 14 пробірок зі скошеним середовищем NBS з 2% сахарози та інкубують у термостаті при 37°C протягом 15 годин.

ТП 6.4 Культивування культури в струшувальних колбах

У колбу з композицією 1 (від ДР 5.1) в асептичних умовах вносять вміст колб з 2 та 3 (від ДР 5.1) композиціями і за допомогою самплера 2 мл розчину CaCl_2 , металів в слідах, тіаміну- HCl та бетаїну – HCl (від ДР 4.1).

Культивування відбувається при рН 7,0, 37°C, 150 об/хв упродовж 12 – 15 годин. Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для визначення сухої маси клітин (потрібна концентрація 1,2 г/л), проводять мікробіологічний контроль.

ТП 6.5 Культивування культури в інокуляторі 30 л

В інокулятор з композицією 1 (від ДР 5.2) в асептичних умовах вносять композиції 2 і 3 (від ДР 5.2) та 21 мл розчину CaCl_2 , металів в слідах, тіаміну- HCl та бетаїну – HCl (від ДР 4.1). Рівень рН = 7 автоматично регулюється 6 % розчином NaOH (від ДР 3.1.1). Далі в асептичних умовах вносять посівний матеріал (від ТП 6.4).

Культивування відбувається при рН 7,0, 37°C, 150 об/хв упродовж 12 – 15 годин. Подають стерильне стиснене повітря (від ДР 2.7).

Кожні 4 години відбирають пробу для визначення концентрації клітин (потрібна концентрація 1,2 г/л), проводять мікробіологічний контроль.

ТП 6.6 Культивування культури в інокуляторі 300 л

В стерильний інокулятор з композицією 1 (від ДР 5.3) самопливом подається композиція 2 (від ДР 5.3) та в асептичних умовах вносять композицію 3 (від ДР 5.3) та 210 мл розчину CaCl_2 , металів в слідах, тіаміну-

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						43
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

HCl та бетаїну – HCl (від ДР 4.1). Посівний матеріал (від ТП 6.5) подається через трубу перетискування. Рівень рН 7 автоматично регулюється 6 % розчином NaOH (від ДР 3.1.2).

Культивування відбувається при рН 7,0, 37°C, 150 об/хв упродовж 12 – 15 годин. Подають стерильне стиснене повітря (від ДР 2.7).

Кожні 4 години відбирають пробу для визначення концентрації клітин (потрібна концентрація 1,2 г/л), проводять мікробіологічний контроль.

ТП 7 Виробничий біосинтез

У ферментер об'ємом 3 м³ з композицією 1 (від ДР 5.4) за допомогою насосів подаються композиції 2 (від ДР 5.4) та 3 (від ДР 5.4). Далі посівний матеріал (від ТП 6.6) подають через трубу перетискування. Рівень рН 7 автоматично регулюється 6 % розчином NaOH (від ДР 3.1.3).

Культивування відбувається при рН 7,0, 37°C, 200 об/хв протягом 48годин.

У ферментер подають стерильне стиснене повітря (від ДР 2.7).

Кожні 4 години відбирають пробу для визначення концентрації клітин (потрібна концентрація 1,2 г/л), цільового продукту (97 г/л L – молочної кислоти), проводять мікробіологічний контроль.

ТП 8 Зберігання культуральної рідини

Після ферментації культуральна рідина за допомогою насоса подається у збірник з якого подається на стадії виділення та очищення молочної кислоти.

ЗВ 9 Знешкодження відходів

ЗВ 9.1 Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря яке надходить з інокляторів та ферментерів направляють в системи очищення повітряних відходів.

ЗВ 9.2 Знешкодження рідких відходів

Відпрацьована вода після миття та дезінфекції (від ДР 1.3, ДР 1.4) поступає в очисні споруди звідки вона потрапляє в каналізацію.

ЗВ 9.3 Знешкодження твердих відходів

Залишки біомаси (від ТП 7) після виділення цільового продукту відправляють на утилізацію.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						44
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1 Методи контролю молочної кислоти

Досліджуваний зразок змішують з дистильованою водою у співвідношенні 1: 3, центрифугують 5 хв. при 12 000 об/хв., супернатант зливають в чисту пробірку;

10 мл досліджуваного супернатанта поміщають в колбу Ерленмейера;

До проби додають 1-2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 н. розчином NaOH при постійному збовтуванні до появи стійкого слаборожевого забарвлення;

Визначають обсяг витраченого на титрування 0,1 н. розчину NaOH, визначають кількість молочної кислоти в °Т.

Визначення показника активності кислотоутворення визначається в мг/л і обчислюється за формулою

$$C = \frac{V \times N \times E}{1000 \times V_p}$$

C – кислотність, мг/л;

V (NaOH) - об'єм гідроксиду натрію, що пішов на титрування, мл;

N (NaOH) - нормальність гідроксиду натрію;

V_p – об'єм проби, мл;

E – еквівалент молочної кислоти (90,08).

На підставі отриманих даних роблять висновок про якість досліджуваного продукту.

					КР.ПЗ.162.08				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Макаренко М.В.							
Перевір.		Волошина І.М.							
Консультант						КНУТД, ББТ-20			
Н. Контр.									
Затверд.		Мокроусова О.Р.							
						45			

2.2.4 Кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера

Молочна кислота під час нагрівання з сірчаною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, взаємодіючи з гідрохіноном, утворює сполуку червоно-коричневого кольору, кількість якої піддається спектрофотометричному визначенню.

Для аналізу готуються пробірки за схемою, наведеною в табл. 5.1.

Пробірки перемішували та інкубували протягом 2-3 хвилин при температурі 20°C. Проінкубовані зразки фільтрували через паперовий фільтр. До пробірок з фільтратами додали реагенти за схемою наведено в табл. 5.2.

Таблиця 5.1.

Приготування проб для першого етапу аналізу

	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Дистильована вода	6,0	6,0
Зразок	1,0	—
Розчин молочної кислоти	—	1,0
Ортофосфорна кислота	1,0	1,0

Таблиця 5.2

Приготування проб для другого етапу аналізу

	Дослідна проба	Контрольна проба
25%-вий розчин сульфату міді, мл	1,0	1,0
Сухий гідроксид кальцію, мг	0,5	0,5

Вміст пробірок активно перемішали. Інкубування проходить за кімнатної температури протягом 5 хв.

Після інкубування проб вміст пробірок фільтрували через паперовий фільтр. Та готували нові пробірки за схемою наведеною в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Приготування проб для третього етапу аналізу

	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Фільтрат	1,0	1,0
10%-вий розчин сульфату міді	0,1	0,1
Концентрована сірчана кислота	4,0	4,0

Проби помістили на кип'ячу водяну баню на 1,5 хвилин та охолодили. Після цього, в кожену пробірку додали по 0,1 мл 20%-го спиртового розчину гідрохінону та вміст перемішали. Проби кип'ять 15 хвилин на водяній бані. Отримані проби дослідили методом спектрофотометрії при довжині хвилі 540 нм. Розрахунок концентрації молочної кислоти в біологічному матеріалі проводили за формулою:

$$C = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}}}{E_{\text{ст.}}}$$

$C_{\text{ст.}}$ — концентрація молочної кислоти у стандартному розчині, мг/мл ;

$E_{\text{ст.}}$ — оптична щільність стандартного розчину молочної кислоти, одиниці оптичної густини;

$E_{\text{досл.}}$ — оптична щільність дослідної проби, одиниці оптичної густини;

C — концентація молочної кислоти в дослідній пробі, мг/мл.

5.2 Методи контролю на стадії біосинтезу

5.2.1 Мікробіологічний контроль композицій поживного середовища та готового

Контроль композицій здійснюється перед змішуванням шляхом засівання проби (50 мл) простерилізованої композиції на чашки Петрі з відповідним

агаризованим поживним середовищем: Середовище Сабуро – для виявлення грибів; м'ясо – пептонний агар – для виявлення бактерій.

1. Підготовка чашок Петрі. чашки Петрі стерилізують у сухожарній шафі. Розплавлене на водяній бані поживне середовище розливають по чашках Петрі (товщина середовища 1 – 2 мм). Чашки залишити на 2 -3 доби для застигання.

2. Посів зразків. В асептичних умовах відбирають пробу 100 мкл та вносять на поверхню відповідного середовища. Рівномірно розподіляють зразок по всій поверхні середовища за допомогою мікробіологічної петлі. Чашки засіяні зразками поміщають в термостат для інкубації: умови для Сабуро – 24 – 26°C, 3 – 5 діб; умови для м'ясо – пептонного агару – 32 - 34°C, 1 – 2 доби.

3. Після інкубації візуально визначають відсутність або присутність мікроорганізмів на чашках Петрі.

5.2.2 Визначення біомаси продуценту

Визначення біомаси *E. coli* WYZ – L здійснюють ваговим методом:

1. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення.

Із цією метою фільтри, попередньо покладені у відкриту чашку Петрі, або центрифужні пробірки розміщують у сушильну шафу й висушують протягом 1-2 год. при температурі 80-85°C і 90-100°C відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами або центрифужні пробірки виймають із сушильної шафи й переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl₂) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких буде проводитися зважування. Через годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують із точністю до 0,0001 г. Висушування й зважування повторюють, дотримуючи зазначеної послідовності операцій, доки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її значеннях не перевищать $\pm 0,0001$ г.

					КР.ПЗ.162.08	Аркуш_
						48
Зм.	Арку	№ Документа	Підпис	Дата		

2.Відокремлення мікроорганізмів від середовища можливо центрифугуванням або фільтруванням.

В центрифужну пробірку наливають точно виміряний обсяг ретельно перемішаної рідкої культури, що залежно від її щільності коливається від 5 до 20 мл. Центрифугують 10 хв при 10000 об/хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знову центрифугують при тому ж числі обертів. Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги. У противному випадку частина осаду може бути загублена. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою. Для відділення бактерій використовують мембранні фільтри. Розміри пор мембранного фільтру повинні бути меншими за величину клітин, біомасу яких визначають. Мембранний фільтр розміщують на пористу пластинку спеціального тримача, вставленого в колбу. Щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водострумного насосу. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

Визначення біомаси. Щоб визначити масу сухих клітин, центрифужну пробірку або фільтр із осадом клітин мікроорганізмів розміщують у сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування й зважування той же, що використовується й при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = (A - B) \times 1000 / V$$

Де M – суха біомаса г/л;

A - маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

B - маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V - обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл. [15]

ВИСНОВКИ

Молочна кислота має багато сфер застосування, такі як: харчова промисловість, косметологія, виробництво пластику, медицина. Даний корисний продукт може бути отриманий як синтетичним шляхом так і шляхом біосинтезу.

Розрахунки потужності були проведені опираючись на річну потребу пластику найбільш відвідуваного закладу швидкого харчування в Україні з ціллю заміни звичайного пластику на біорозкладний, а саме полілактид (PLA), для виготовлення якого сировиною являється молочна кислота.

Проаналізувавши наукову літературу на тему біосинтезу молочної кислоти, обравши п'ять продуктивних біологічних агентів та оцінивши їх економічну ефективність, для біосинтезу я обрав штам *Escherichia coli* WYZ-L, який був створений за допомогою генної інженерії спеціально для посиленого зброджування сахарози з утворенням молочної кислоти.

Розроблено технологічну схему отримання молочної кислоти за допомогою *Escherichia coli* WYZ-L у біореракторі об'ємом 3 м³ та наведено її опис.

Описано самі важливі методики контролю стадії біосинтезу та готового продукту (молочної кислоти).

					КР.ПЗ.162.08					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ			Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.								
Перевір.		Волошина І.М.								
Консультант								КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.										
Затверд.		Мокроусова О.Р.								
					50					

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ДСТУ 4621:2006. КИСЛОТА МОЛОЧНА ХАРЧОВА Загальні технічні умови. На заміну ГОСТ 490–79 ; чинний від 2006-06-29. Вид. офіц. Київ, 2007. 24 с.
2. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 612, Lactic Acid" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-Acid>. Accessed 16 June, 2024.
3. Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Marian E Quinn. Handbook of Pharmaceutical Excipients SIXTH EDITION. *Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association* 2009. 355-356.
4. Polylactic acid production from biotechnological routes: A review / T. L. de Albuquerque et al. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 186. P. 933–951. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.074>.
5. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* W for l-lactic acid fermentation from molasses and corn steep liquor without additional nutrients / Y. Wang et al. *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 148. P. 394–400. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.114>.
6. l-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1 / T. Gao et al. *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 121. P. 105–110. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.108>.
7. Kotzamanidis C., Roukas T., Skaracis G. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 18, no. 5. P. 441–448. URL: <https://doi.org/10.1023/a:1015523126741>.

					КР.ПЗ.162.08				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Макаренко М.В.							
Перевір.		Волошина І.М.							
Консультант							КНУТД, ББТ-20		
Н. Контр.									
Затверд.		Мокроусова О.Р.							
					51				

8. Simultaneous saccharification and fermentation of xylo-oligosaccharides manufacturing waste residue for l-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* / L. Zhang et al. *Biochemical Engineering Journal*. 2015; 94:92–99. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.020>.

9. Біомой, мішок 20 кг (ID#1193043994), ціна: 5600 ₴, купити на Prom.ua. *prom.ua*. URL: <https://prom.ua/ua/p1193043994-biomoj-meshok.html> (дата звернення: 11.06.2024).

10. Біомой. Методичні вказівки (інструкція по застосуванню). *dezmed.com.ua*. URL: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/> (дата звернення: 20.05.2024).

11. Засіб дезінфекційний "Бланідас-А Форте" (Blanidas-A Forte), 20л. *clean-ua.com*. URL: <https://clean-ua.com/blanidas-a-forte-20l/> (дата звернення: 21.05.2024).

12. Дезінфекційний засіб «Віндез ЧАС-С». *Санітарний щит України*. URL: <https://sans.com.ua/katalog/deznfeksyniy-zasb-vndez-chas-s/> (дата звернення: 21.05.2024).

13. В.В. Мінухін, Н.І. Коваленко, Т.М. Замазій. Модуль 3. Частина 2. Родина кишкових бактерій : метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика". Харків: ХНМУ, 2014. 4 с.

14. Пирог Т., Ігнатова О. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.

15. М.Д.Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. Промислова біотехнологія: навч. посібник. Київ, 2014. 191-194с.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Київський національний університет технологій та дизайну
Національний університет
«Чернігівський колегіум» імені Т. Г. Шевченка
Національний авіаційний університет
Університет Григорія Сковороди в Переяславі
Одеський державний аграрний університет
Донбаська державна машинобудівна академія (м. Тернопіль)
Академія прикладних наук
Вища школа управління та адміністрації в м. Ополе (Польща)



ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ

IX Всеукраїнської науково-практичної конференції
*«Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та
мультилінгвального глобалізованого світу»*

11 квітня 2024р.

Київ

Mykyta Makarenko

Kyiv National University of Technology and Design (Kyiv)

Scientific supervisor – Vitalina Denysenko

LACTIC ACID BACTERIA IN THE FOOD INDUSTRY

1. Fermented food

Certain strains of probiotics, such as *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Enterococcus*, have the ability to thrive and remain viable throughout the fermentation process. These beneficial bacteria are commonly found in a variety of fermented foods, including yogurt, sauerkraut, kimchi, and kefir. LAB commonly found in fermented foods include *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Enterococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, etc. ICBs are indeed involved in the production of a wide range of fermented food products, including alcoholic beverages, fermented bread and noodles, fermented fish and meat, fermented milk products and fermented vegetables (Abdul Hakim BN, Xuan NJ, Oslan SNH. A Comprehensive Review of Bioactive Compounds from Lactic Acid Bacteria: Potential Functions as Functional Food in Dietetics and the Food Industry. *Foods*. 2023; 12(15):2850.). During the fermentation of sourdough bread, the joint use of lactic acid bacteria (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Furfurilactobacillus rossiae* and *Lactocaseibacillus casei*) and yeast produces compounds associated with the sour aromas of bread and contributes to the aromatic characteristics of bread. Some *Lactobacillus* strains, such as *Lentilactobacillus buchneri*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Limosilactobacillus fermentum* and *Levilactobacillus brevis*, can convert 2-acetolactate to acetoin, involved in flavor formation in Zhenjiang aromatic vinegar (Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the

expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>)

Lactobacillus plantarum is commonly found in fermented vegetables due to its resistance to acid and salt under specific fermentation conditions. Fish that was often fermented contained *L. plantarum*, making it safe to eat. Commercial yogurt contains live cultures such as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, which are added during production to create a unique texture, taste and nutritional value (Abdul Hakim et. al., 2023). Lactic acid bacteria have the ability to degrade phytic acid, which affects the taste of food and is difficult to digest. For example, in the fermentation process of yam-based products, phytase produced by *Leuconostoc lactis* CCMA 0415, *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0744 and *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0745 can degrade phytic acid. *Lactobacillus helveticus* can be used as an auxiliary starter for the hydrolysis of bitter peptides in cheese production (4).

2. Vitamins

L. plantarum showed the highest folic acid production compared to other LAB. Additionally, *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* are common LAB used as starter in yogurt production due to their folate synthesizing capabilities (Abdul Hakim et. al., 2023).

3. Preservation of food products

LAB *L. lactis*, in addition to demonstrating antimicrobial activity against *L. monocytogenes* and *S. aureus* in Quark-type cheese, also demonstrated an effect on filamentous fungi and yeasts from spontaneous growth during 21 days of product storage. Zhao et al. confirmed that compounds produced by *L. plantarum* are able to inhibit *Aspergillus Niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum*. In another study by Guimarães et al.,

compounds produced by *L. plantarum* and *Lactobacillus buchneri* were able to prevent the growth of *Penicillium nordicum* as well as the production of ochratoxin (Souza, LV, Martins, E., Moreira, IMFB, & De Carvalho, AF (2022). Strategies for the development of bioprotective cultures in food preservation. International Journal of Microbiology (Print), 2022, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2022/6264170>.)

REFERENCES

1. Hakim, BNA, Xuan, NJ, & Oslan, SNH (2023). A Comprehensive Review of Bioactive Compounds from Lactic Acid Bacteria: Potential Functions as Functional Food in Dietetics and the Food Industry. *Foods*, 12(15), 2850. <https://doi.org/10.3390/foods12152850>
2. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
3. Souza LV, Martins E, Moreira IMFB, de Carvalho AF. Strategies for the Development of Bioprotective Cultures in Food Preservation. *Int J Microbiol*. 2022 Dec 14; 2022:6264170. doi: 10.1155/2022/6264170. PMID: 37645592; PMCID: PMC10462446.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

**Освіта для сталого майбутнього:
екологічні, технологічні, економічні
і соціокультурні питання**

Колективна монографія

Київ 2024

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ ДРІЖДЖІВ ДЛЯ СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК МЕТАЛІВ

**О. О. ЛУЦІЙ, М. В. МАКАРЕНКО, В. В. МОРИН, І. О. ГРЕЦЬКИЙ,
О. А. ШИДЛОВСЬКА**

*Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Мала
Шияновська, 2, Київ, 01011, olgashydlovska@gmail.com*

Зелений синтез наночастинок металів є надзвичайно перспективним, оскільки є економічно-вигідним та безпечним способом отримання ефективних агентів з яскравою біологічною дією. В роботі було проведено підбір ресурсу для синтезу наночастинок та проведено експериментальний біогенний синтез наночастинок срібла для встановлення найкращого варіанту. Таким чином, найкращими властивостями для синтезу наночастинок срібла володіє штам дріжджів *S. cerevisiae* 530. Використання супернатанту або лізату дозволяє регулювати розмір наночастинок та біологічні властивості, що полягають в ефективній антибактеріальній дії проти *E. coli* та ефективній стимуляції росту бактерії *L. delbrueckii*. Отримані результати є перспективними для подальшого вивчення та розробки комплексних антибіотичних препаратів.

1 Вступ

Синтез наночастинок металів є ключовим аспектом наукових досліджень та промислового застосування у різних галузях, включаючи каталіз, медицину та електроніку. Останнім часом зелений синтез наночастинок металів став популярним напрямком досліджень, оскільки він відзначається низьким впливом на довкілля і пропонує кілька переваг порівняно з хімічним та фізичним синтезом.

Однією з найважливіших переваг зеленого синтезу наночастинок металів є його екологічна безпека. У порівнянні з традиційним хімічним синтезом, зелений синтез вимагає меншої кількості шкідливих хімічних речовин і забруднюючих викидів. Зелені методи використовують біоресурси або нейтральні речовини, що робить їх більш прийнятними для навколишнього середовища [1].

Зелений синтез наночастинок металів надає більшу вибірковість та можливість регулювання розміру частинок. В останні роки розроблено численні методи, які дозволяють контролювати розмір та розподіл наночастинок. Ця властивість є критично важливою для налаштування властивостей наночастинок з метою їх застосування в конкретних сферах.

Зелений синтез наночасток металів може призводити до формування частинок з особливими функціональними властивостями, що дозволяють їх застосовувати в різних галузях, таких як каталіз, сенсорика, медицина і нанoeлектроніка [2].

Зелений синтез може бути ефективнішим та економічно вигіднішим в порівнянні з хімічним або фізичним синтезом, оскільки він може значно знизити витрати на сировину та енергію. Застосування біоресурсів та м'яких умов синтезу може зменшити витрати виробництва [3].

Наночастки срібла привертають значну увагу у наукових та медичних дослідженнях завдяки своїм унікальним властивостям та потенційному застосуванню в біологічних системах. Наночастки срібла відзначаються високою активністю проти бактерій, вірусів та грибків, що робить їх об'єктом досліджень у сферах антимікробних застосувань. Зелений синтез наночасток срібла з біоресурсів може покращити їх біологічні властивості, зменшуючи токсичність та підвищуючи ефективність. Зелений синтез наночасток срібла дозволяє знизити їхню токсичність шляхом оптимізації умов синтезу та використання біоресурсів. Це робить їх більш прийнятними для біологічних систем і підвищує їх безпеку в медичних застосуваннях [4].

Наночастки срібла можуть бути використані для доставки лікарських засобів в конкретні місця в організмі. Зелений синтез дозволяє контролювати розмір та форму наночасток, що покращує їхню здатність до призначеної доставки лікарських препаратів [5]. Наночастки срібла можуть бути використані для покращення методів діагностики та зображення в медицині. Вони можуть функціонувати як контрастні агенти для позитронно-емісійної томографії (ПЕТ), магнітно-резонансної томографії (МРТ) та інших методів [6].

Зелений синтез наночасток срібла відкриває широкий спектр перспектив для біологічних досліджень та медичних застосувань. Ці наночастки демонструють антимікробні властивості, можуть бути

використані для доставки лікарських засобів, покращити методи діагностики та зображення та знизити токсичність. Це робить їх важливим об'єктом досліджень і розвитку в галузі біології та медицини.

Враховуючи актуальність зеленого синтезу наночастинок металів, метою нашої роботи було підібрати об'єкт та ресурс для синтезу наночастинок металів.

2 Матеріали і методи

2.1 Дослідження цитотоксичності солей металів на культурі клітин дріжджів *Saccharomyces sp.*

Перед плануванням зеленого синтезу наночастинок провели дослідження по толерантності можливих біологічних агентів для зеленого синтезу до вихідних солей металів. Для цього, на культурах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 530 та *Saccharomyces cerevisiae* 1995 проаналізували цитотоксичність солей AgNO_3 та CuSO_4 в концентраціях від 0,001мМ до 10мМ. Для цього, приготували серійні розведення солей в 96-лунковому планшеті, після чого внесли до них відповідну денну культуру дріжджів, вирощену на бульйоні Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна), в концентрації, що відповідає 0,1ОД. Після цього інкубували 24 год при 28°C. Далі, проводили аналіз життєздатності живих клітин дріжджів за допомогою тесту із резазурином. До культур дріжджових клітин вносили по 50 мкл розчину резазурилату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки цитотоксичної дії металів приймали контроль дріжджових клітин (до відповідних лунок була внесена дистильована вода замість розчину солі) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою

інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували т-критерій Вілкоксона.

2.2 Зелений синтез наночастинок металів срібла та міді

Для проведення зеленого синтезу наночастинок використовували сіль AgNO_3 . Біологічний матеріал був підготовлений наступним чином. В колбах з бульйоном Сабуро вносили добову культуру дріжджів (*S. cerevisiae* 530 або *S. cerevisiae* 1995) в концентрації, що відповідає 0,1 ОД. При 28°C проводили вирощування бульйонних культур при постійному перемішування 180 об/хв протягом 4 діб. Після інкубації відділяли надосад від біомаси за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин. Отримані надосад і біомасу використовували в якості біологічного агенту для синтезу наночастинок срібла та міді. До надосаду додавали суху сіль AgNO_3 та розчиняли її для досягнення кінцевої концентрації у 100 мМ. Для біомаси готували 100 мМ розчин солі AgNO_3 на дистильованій воді, до якого додавали біомасу відповідного штаму дріжджів для отримання лізату. Після цього інкубували зразки при 37° C та 180 об/хв протягом 4 діб. Утворення наночастинок аналізували візуально по зміні кольору реакційної суміші: розчин з наночастинами срібла змінювався на червонувато-коричневий, а розчин з наночастинами міді – на зеленувато-блакитний.

Після проведення ферментації отримані розчини з наночастинами очищували за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин та стерилізації через мікрофільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Отримані очищені розчини використовували для подальших досліджень.

2.3 Визначення розмірів синтезованих наночастинок методом динамічного розсіювання світла

Отримані золі наночастинок були проаналізовані з використанням Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобританія) для визначення розмірів методом динамічного розсіювання світла (DLS).

2.4 Дослідження антибактеріальної дії синтезованих наночастинок срібла

Для визначення антибактеріальної дії наночастинок срібла використовували референтний штам *Escherichia coli* K12 та штам нормофлори людини *Lactobacillus delbrueckii*. Визначення антибактеріальної дії наночастинок срібла проводили за наступною схемою. Для отриманих наночастинок проводили серійні 10-кратні розведення таким чином, щоб кінцева концентрація досліджуваних зразків становила від 0,1 до 10,0 мМ. Розведення наночастинок проводили в 96-лунковому планшеті на середовища NB (ТОВ «Фармактив», Україна). До отриманих розведень вносили відповідні бактеріальні культури в кінцевій концентрації, що відповідає 0,1 ОД. Планшети інкубували при 37°C протягом доби. Після цього визначали життєздатність бактеріальних клітин за допомогою тесту з резазуринатом. До культур бактеріальних клітин вносили по 50 мкл розчину резазуринату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки антибактеріальної дії наночастинок приймали контроль відповідного штаму бактеріальної культури (до лунок була внесена дистильована вода замість розчину наночастинок) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували t-критерій Вілкоксона.

3 Результати досліджень

Першим етапом дослідження було встановлення цитотоксичності солей металів срібла та міді на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995. Результати дослідження цитотоксичності солі AgNO_3 представлені на рисунку 1.

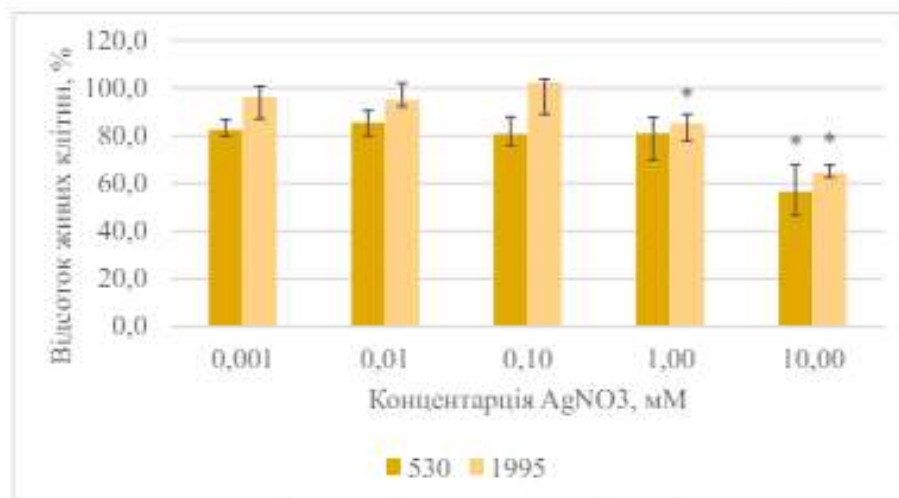


Рисунок 1 – Цитотоксичність AgNO₃ на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Достовірне зниження показника відсотку живих клітин спостерігаємо в концентрації AgNO₃ 1,0 мМ для штаму *S. cerevisiae* 1995 – зниження на 19,1% ($p \leq 0,05$) в порівнянні з контролем, прийнятим за 100%. Також, в максимальній досліджуваній концентрації 10,0 мМ AgNO₃ викликає зниження життєздатності культур *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 на 44,4% та 35,5% відповідно ($p \leq 0,05$). Солі срібла, зокрема AgNO₃, відомі своєю високою токсичністю для мікроорганізмів та біологічних систем. Останні дослідження свідчать про те, що AgNO₃ може викликати відмирання дріжджів *S. cerevisiae* шляхом інгібування клітинного поділу та порушення генетичних процесів. Токсичність AgNO₃ може бути пов'язана зі змінами у структурі та функціях білків, а також іншими молекулярними подіями [7].

Сіль CuSO₄ проявила достовірне збільшення життєздатності клітин штаму *S. cerevisiae* 530 в концентраціях 0,001 мМ, 0,01 мМ та 1,0 мМ – на 2,7%, 7,3% та 4,9% відповідно (рис. 2). Даний аспект цікавий в ракурсі можливої оптимізації процесу отримання наночасток на основі біомаси дріжджових клітин.

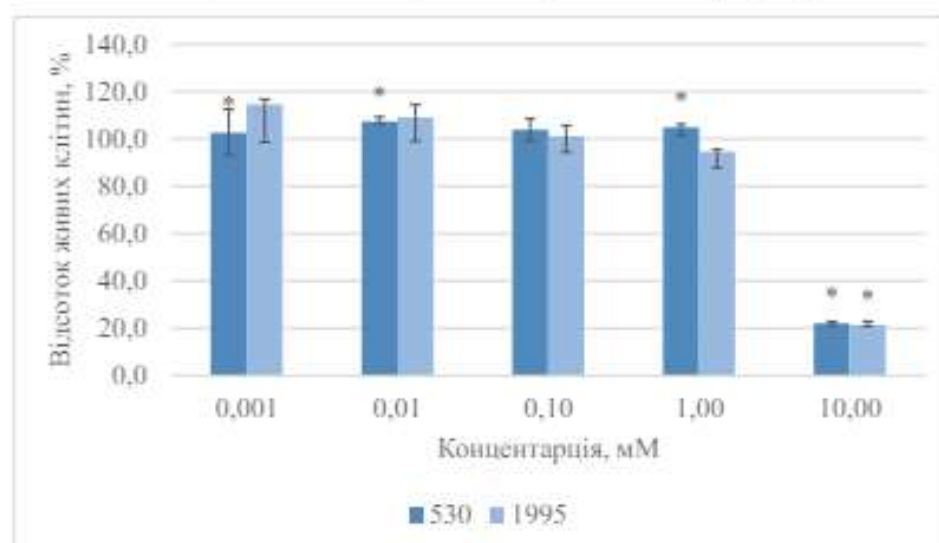


Рисунок 2 – Цитотоксичність CuSO_4 на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Концентрація солі CuSO_4 10 мМ проявляє значну токсичність для обох досліджених штамів дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 – зниження показника відсотку живих клітин на 78,1% та 78,6 відповідно. Загалом, у всіх досліджених концентраціях солей AgNO_3 або CuSO_4 вони не викликають значної токсичної дії на дріжджові клітини, окрім концентрації AgNO_3 або CuSO_4 10,0 мМ. Солі міді, зокрема CuSO_4 , також виявляють токсичність для *S. cerevisiae*. Дослідження показали, що CuSO_4 може призводити до окислення та дисфункції білків у клітинах дріжджів [8]. Токсичність цієї солі також пов'язана з її здатністю до активної інтеракції з молекулами сірки та іншими біологічно активними сполуками [9]. Можна зробити висновок, що дані штами більше підходять для синтезу наночасток срібла. Тому подальший етап буде проводитися із використанням солі AgNO_3 .

За допомогою методу DLS було встановлено розміри отриманих наночасток. Результати вимірів представлені в таблиці 1. Найменший розмір наночастки мають у зразку, в якому для зеленого синтезу наночасток срібла використали біомасу дріжджів *S. cerevisiae* 530. Загалом,

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

синтезовані наночастки за допомогою *S. cerevisiae* 1995 мають більші розміри, ніж наночастки синтезовані за допомогою *S. cerevisiae* 530.

Таблиця 1 – Розміри синтезованих зеленим синтезом наночасток

штам <i>S. cerevisiae</i>	супернатант		біомаса (лізат)	
	1995	530	1995	530
	277,5±98,73	353,2±106,2	174,85±63,72	168,55±55,03

При дослідженні антибактеріальної дії на бактеріальному штамі *E. coli* отриманих наночасток було встановлено, що всі зразки володіють антибактеріальною дією на рівні контролю – розчину AgNO_3 відповідної концентрації (рис. 3). Проте, для зразків наночасток срібла, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ, показана більша антибактеріальна дія, ніж для контролю AgNO_3 – значення на 16,7% та 36,7% менші, ніж у контролі AgNO_3 в концентрації 1 мМ.

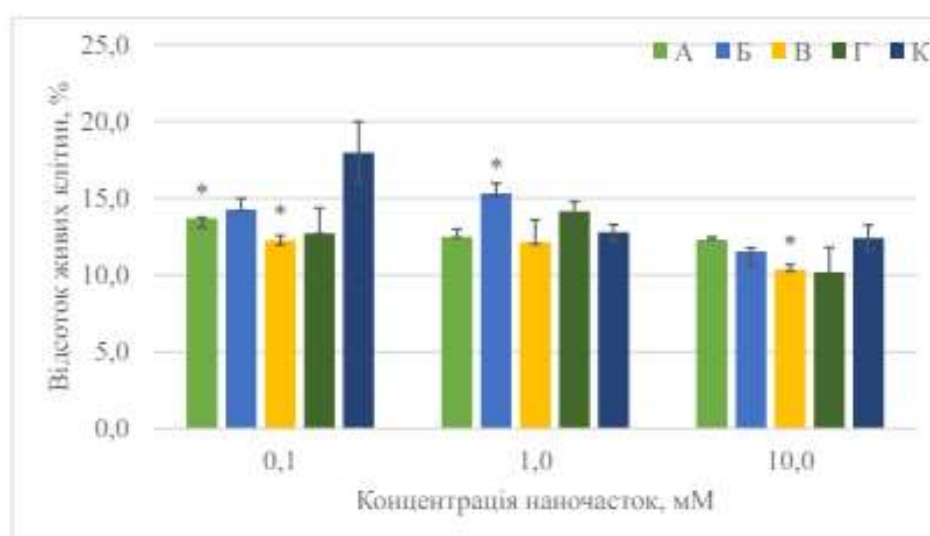


Рисунок 3 – Антибактеріальна дія наночасток, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *E. coli*. К – розчин солі AgNO_3 (* $p \leq 0,05$)

Також, для зразку наночасток, отриманих з лізату *S. cerevisiae* 530 показано зниження значення відсотку живих клітин на 16,1% в порівнянні з AgNO_3 в концентрації 10 мМ. AgNPs спричиняють зупинку клітинного

поділу у бактеріях шляхом впливу на структуру ДНК та мембранних білків [10]. AgNPs також взаємодіють з ферментами бактерій, порушуючи їхні молекулярні процеси та призводячи до інгібування росту та розмноження [11]. Генерування вільних радикалів кисню: AgNPs можуть генерувати вільні радикали кисню, які завдають пошкоджень бактеріальним мембранам та біологічним молекулам [12]. Останні дослідження вказують на ефективність AgNPs, отриманих зеленим синтезом на дріжджах *S. cerevisiae*, у боротьбі з різними видами бактерій, включаючи патогенні штами, що виявили стійкість до антибіотиків [13]. Ці дослідження відкривають перспективи використання AgNPs як антибактеріальних агентів у медицині та інших галузях.

При дослідженні антибактеріальної дії на *L. delbrueckii*, було встановлено, що всі досліджені наночастки не володіють цитотоксичною дією, навпаки, вони здатні інтенсифікувати життєздатність клітин *L. delbrueckii*. При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 0,1 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 23,4%, 12,5%, 14,4% та 19,1% відповідно (рис. 4).

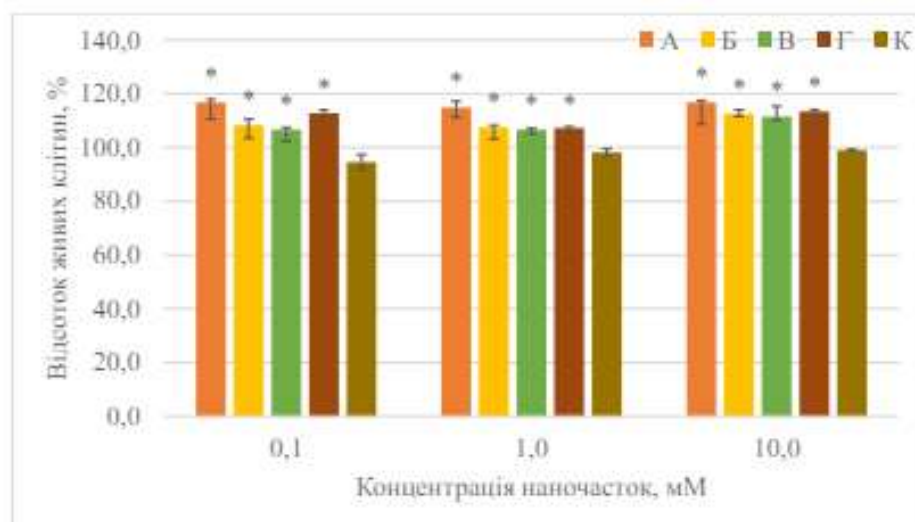


Рисунок 4 – Антибактеріальна дія наночасток, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *L. delbrueckii*, К – розчин солі AgNO_3 (* $p \leq 0,05$)

При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 1,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,1%, 8,7%, 9,4% та 9,2% відповідно. При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 10,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,9%, 12,6%, 13,7% та 14,5% відповідно. Загалом, найбільший позитивний вплив на життєздатність клітин *L. delbrueckii* мають наночастки срібла, отримані з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Подібних досліджень в науковій літературі на даний момент не існує, а тому перспектива посилення життєдіяльності бактерій нормофлори людини є надзвичайно важливою та перспективною.

Висновки

В даній роботі було проведено дослідження витривалості дріжджових клітин штамів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 до різних концентрацій солей AgNO_3 або CuSO_4 . Встановлено, що найкраще всього дріжджі переносять вплив солі AgNO_3 . Саме тому, було проведено синтез наночасток срібла за допомогою двох штамів *S. cerevisiae* та в різних схемах, а саме з використанням лізату та супернатанту. Було встановлено, що найменші наночастки були отримані з використанням лізату *S. cerevisiae* 530, проте найефективнішу антибактеріальну дію проявили наночастки, отримані з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ. Також, варто зазначити, що й позитивніший ефект щодо посилення життєздатності клітин нормофлори людини *L. delbrueckii* має зразок наночасток, отриманий з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Таким чином, нами було встановлено, що саме штам дріжджів *S. cerevisiae* 530 найкраще підходить для синтезу наночасток срібла, а умови проведення біогенного синтезу можуть регулювати розмір наночасток та їх біологічні властивості. Отримані результати можуть бути доповнені розширеним

спектром біологічним досліджень. Більше того, наночастки срібла, отримані зеленим синтезом, мають перспективи у застосування комплексної терапії бактеріальних захворювань.

Література

1. Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*. 2022, 26, 102336-102356.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186422000359>
2. Pandit, C., Roy, A., Ghotekar, S., Khusro, A., Islam, M. N., Emran, T. B., Lam, S. E., Khandaker, M. U., Bradley, D. A. Biological agents for synthesis of nanoparticles and their applications. *Journal of King Saud University-Science*. 2022, 34(3), 101869-101882.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364722000507>
3. Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseimifar, S. H., Raeeszadeh, M. Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles—A Review. *Biological Trace Element Research*. 2023, 1-27. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-023-03645-9>
4. Vishwanath, R., Negi, B. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2021, 4, 100205-100217.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666086521001521>
5. Gomes, H. I., Martins, C. S., Prior, J. A. Silver nanoparticles as carriers of anticancer drugs for efficient target treatment of cancer cells. *Nanomaterials*. 2021, 11(4), 964-995. <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/964>
6. Nadaf, S. J., Jadhav, N. R., Naikwadi, H. S., Savekar, P. L., Sapkal, I. D., Kambli, M. M., Desai, I. A. Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Updates on research, patents, and future prospects. *OpenNano*. 2022, 100076-1000101.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235295202200038X>