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 ксантану»

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

Виконала: студентка групи ББТ-22
Лагутіна Ю. О.
Науковий керівник: к.т.н., доц.
Волошина І.М.
Рецензент: к.т.н., доц. Охмат О.А.

Київ 2026

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри БШХ

_____Олена МОКРОУСОВА
«___»_____20___ р.

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Лагутіній Юлії Олександрівні

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Технологія біосинтезу ксантану**
Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «17» березня 2026 року № 62-уч

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи*:* завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо технології біосинтезу ксантану; технологічні параметри біосинтезу ксантану; 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 17.03.2026 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

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

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Юлія ЛАГУТІНА

Науковий керівник _____ Ірина ВОЛОШИНА

АНОТАЦІЯ

Лагутіна Юлія. Технологія біосинтезу ксантану – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2026 рік.

У межах кваліфікаційної роботи розглянуто технологічний процес синтезу ксантанової камеді за допомогою високопродуктивного штаму *Xanthomonas campestris* B6720.

У кваліфікаційній роботі представлено технологічну схему біосинтезу ксантану при культивуванні штаму *Xanthomonas campestris* B6720. Обґрунтовано вибір біологічного агенту і наведено його основні характеристики, обрано склад поживного середовища, умови культивування та вибір технологічного обладнання. Проведено розрахунки для реалізації біосинтезу. Проєктна технологічна схема передбачає стадію допоміжних робіт, стадію технологічного процесу, стадію біосинтезу, стадію знешкодження відходів. Обрано методики контролю на виробництві.

Ключові слова: ксантан, Xanthomonas campestris, біосинтез, біотехнологія.

					КР.ПЗ.162.04			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Лагутіна Ю.О.			**АНОТАЦІЯ**	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Волошина І.М.				Д	4	1
						КНУТД, ББТ-22		
Н.Контр.								
Затвердив								

ABSTRACT

Lagutina Yulia. Technology of xanthan biosynthesis – Manuscript.

Qualification work for the specialty 162 “Biotechnology and Bioengineering”. – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2026.

Within the framework of the qualification work, the technological process of xanthan gum synthesis using the high-performance strain *Xanthomonas campestris* B6720 is considered.

The qualification work presents a technological scheme for xanthan biosynthesis during the cultivation of the strain *Xanthomonas campestris* B6720. The choice of the biological agent is substantiated, and its main characteristics are provided. The composition of the nutrient medium, cultivation conditions, and selection of technological equipment are chosen. Calculations for the implementation of biosynthesis are performed. The designed technological scheme includes a stage of auxiliary works, a stage of the technological process, a stage of biosynthesis, and a stage of waste neutralization. Control methods for production are selected.

Keywords: xanthan, Xanthomonas campestris, biosynthesis, biotechnology.

ЗМІСТ

ВСТУП 8
РОЗДІЛ 1 10
ТЕХНІКО – ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ 10
1.1 Характеристика продукту – ксантана 11
1.2 Потреба у ксантані 12
1.3 Розрахунок потужності виробництва 14
1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів отримання культурної рідини та розрахунок об’єму ферментера. 16
Висновок до розділу 1 17
РОЗДІЛ 2 18
ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА 18
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту та поживного середовища для його культивування 18
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу 24
2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера 24
2.2.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря 26
2.2.3 Обґрунтування вибір мийних та дезінфікуючих засобів 28
2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу 34
2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для ферментатора об’ємом 1 м^3 34
2.3.2. Розрахунок кількості підготовки посівного матеріалу для посівного апарату об’ємом 100 л 34
2.3.3. Розрахунок кількості підготовки посівного матеріалу для інокулятору об’ємом 10 л 35
2.3.4. Розрахунок кількості підготовки посівного матеріалу для колб 36
Висновок до розділу 2 36
РОЗДІЛ 3 38
ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА 38
3.1 Таксономічний статус 38
3.2 Морфолого – культуральні властивості 38
3.3 Фізіолого – біохімічні ознаки 39
Висновок до розділу 3 40

РОЗДІЛ 4 41
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 41
4.1 Поетапний блок-схема технології 41
4.2 Опис технологічної блок схеми 41
Висновок до розділу 4 58
РОЗДІЛ 5. 59
КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ 59
5.1. Визначення споживання джерела вуглецю 59
5.2. Визначення рівня біомаси культури 60
5.3. Визначення чистоти культури 60
5.4. Визначення накопичення ксантану 60
Висновок до розділу 5 61
ВИСНОВКИ 62
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 64

ВСТУП

Актуальність теми. Ксантанова камедь (ксантан) є універсальним біополімером, який знаходить широке застосування у різних галузях. У харчовій промисловості цей полісахарид виконує роль стабілізатора, загусника та емульгатора, забезпечуючи потрібну консистенцію у соусах, заправках, молочних десертах та безглютеновій випічці. У фармацевтиці ксантан використовується як допоміжна речовина для пролонгованого вивільнення активних компонентів у таблетках і суспензіях. Косметична індустрія застосовує його для регулювання в'язкості у виробах, таких як шампуні, креми, гелі та зубні пасти. У нафтовидобуванні ксантанова камедь підвищує ефективність бурових розчинів, тоді як у сільському господарстві вона входить до складу пестицидних формуляцій. В Україні виробництво ксантану промисловим способом поки відсутнє, а попит повністю задовольняється імпортом, що підкреслює необхідність розвитку власної біотехнологічної бази.

Мета роботи – отримання ксантану шляхом біосинтезу з використанням штаму *Xanthomonas campestris* B6720.

Завдання роботи:

1. Вивчити характеристику ксантану, як цільового продукту.

2.Визначити ефективність застосування різних біологічних агентів та їх штамів для реалізації технології біосинтезу ксантану.

3. Провести розрахунок потужності виробництва для здійснення біосинтезу ксантану.

4. Обґрунтувати та описати схему біосинтезу ксантану.

5. Описати методи контролю проведення біосинтезу та готового продукту.

Об'єктом дослідження є властивості штаму *Xanthomonas campestris* B6720 та його застосування для здійснення біосинтезу ксантану.

Предмет дослідження – технологія біосинтезу ксантану.

Методи дослідження. У кваліфікаційній роботі використано методи добору та аналізу наукової та технічної літератури; математичні розрахунки та розробка технологічної схеми.

Новизна одержаних результатів. Розроблено та науково обґрунтовано технологічну схему здійснення біосинтезу ксантану, яка базується на керованому культивуванні штаму *Xanthomonas campestris* B6720, що дозволяє оптимізувати стадії ферментації.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновані технологічні рішення та параметри культивування штаму *Xanthomonas campestris* B6720 можуть бути використані при проектуванні нових або модернізації діючих біотехнологічних виробництв мікробних екзополісахаридів з метою підвищення ефективності процесу ферментації».

Апробація. Результати роботи за темою оприлюднені на Всеукраїнській наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (КНУТД, Київ, 17 квітня 2026 р.).

Публікації. За темою кваліфікаційної роботи опубліковано тези доповіді конференції Всеукраїнського рівня (Додаток А):

Гусейнова К.Е., Потупа В.Ю., **Лагутіна Ю.О.,** Шкотова Л.В., Волошина І.М. Мікробні екзополісахариди у фармацевтичній галузі : зб. тез доповідей Всеукр. наук. конф. (м. Київ, 17 квітня 2026р.) ; за авторською редакцією. Київ : КНУТД, 2026. С. 149 – 150.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Основний текст кваліфікаційної роботи викладений на 56 сторінках, містить 5 розділів, висновки та список використаної літератури з 24 джерела, 1 додаток.

РОЗДІЛ 1
ТЕХНІКО – ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Ксантанова камедь має дуже широке застосування у різних галузях промисловості завдяки своїм стабілізуючим, загущуючим та структуроутворюючим властивостям.

У харчовій промисловості ксантан використовується як харчова добавка Е415. Його додають до соусів, майонезів, кетчупів, салатних заправок, морозива, молочних продуктів, безглютенової випічки та напоїв. Він стабілізує емульсії, запобігає розшаруванню продуктів і покращує їх текстуру. У безглютенових продуктах ксантан частково замінює функції глютену, забезпечуючи еластичність та структуру тіста.

У фармацевтичній промисловості ксантан використовується як допоміжна речовина при виробництві таблеток, капсул, суспензій та гелів. Він виконує функції стабілізатора, загущувача та агента контрольованого вивільнення активних речовин.

У косметичній промисловості ксантан широко застосовується у складі шампунів, кремів, лосьйонів, зубних паст і гелів для душу. Він забезпечує необхідну консистенцію продуктів, стабілізує емульсії та покращує їх розподіл на поверхні шкіри або волосся. Наприклад, у шампунях ксантан використовується для підвищення в’язкості та стабілізації піни.

У нафтовій та газовій промисловості ксантан застосовується у бурових розчинах для підвищення їх в’язкості та стабілізації твердих частинок. Завдяки своїй реології він ефективно утримує частинки породи у суспензії та покращує транспортування бурового шламу.

У сільському господарстві ксантан використовується як компонент у формуляціях пестицидів і добрив для покращення стабільності та рівномірності нанесення.

1.1 Характеристика продукту – ксантана

Ксантанова камедь (формула $C_{35}H_{49}O_{29}$) – це біополісахарид-загусник мікробного походження, який навіть у низьких концентраціях утворює стабільні, псевдопластичні розчини, стійкі до змін pH, температури та високого сольового фону, що зумовлює її широке використання як стабілізатора, емульгатора та структуроутворювача в харчовій, косметичній, фармацевтичній та нафтовій галузях[1].



Рис. 1.1. Зображення ксантанової камеді

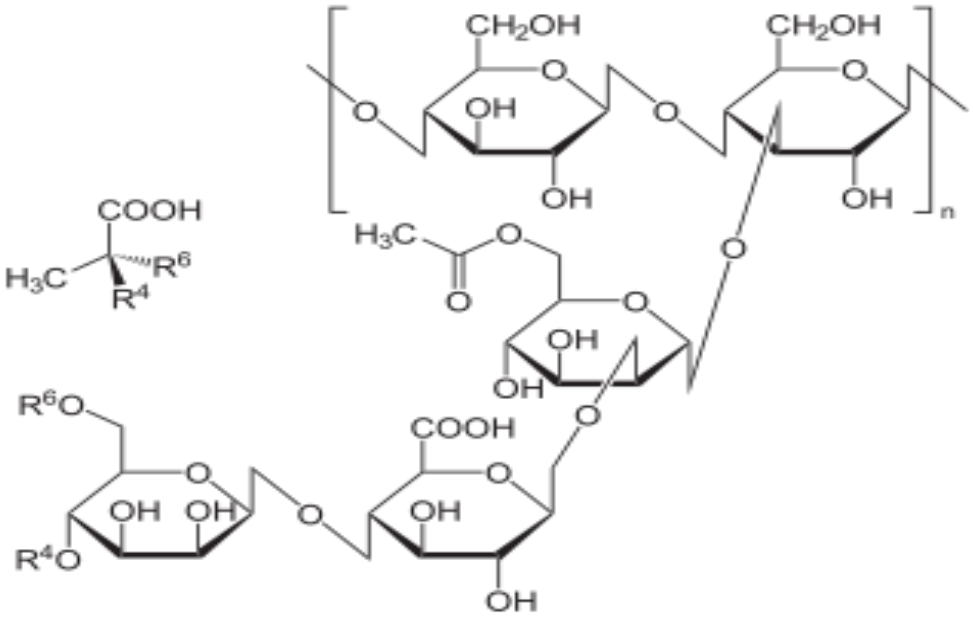

Рис. 1.2. Структурна формула ксантанової камеді

Ксантанова камедь, або ксантан, є екзополісахаридом, отриманим шляхом ферментації вуглеводів бактеріями *Xanthomonas campestris*. У промисловому варіанті це тонкодисперсний порошок, зазвичай білого або

світло-кремового кольору, іноді з ледь помітним жовтуватим відтінком. Органолептичні характеристики ксантану включають практично невідчутний запах, який може бути слабко нейтральним чи “борошнистим”. Смак також нейтральний, без сильновиражених відтінків, хоча при зволоженні може створювати легку слизистість.

По консистенції він представляє собою сухий сипкий порошок, схильний до утворення агломератів за умов підвищеної вологості. Ксантан добре розчиняється у воді, формуючи в’язкі псевдопластичні розчини, які густішають у спокійному стані та стають більш текучими при змішуванні чи механічному впливі. Завдяки таким властивостям, його широко застосовують як загусник, стабілізатор і структуруючий агент у харчовій, фармацевтичній і агрохімічній галузях. Хімічно ксантан є високомолекулярним аніонним полісахаридом, який вирізняється стабільністю у широкому діапазоні pH та температур. Він також стійкий до впливу більшості ферментів і солей, що робить його незамінним для стабілізації колоїдних систем і суспензій.

1.2 Потреба у ксантані

Сучасна індустрія косметичних засобів для догляду за волоссям активно розвивається та не може існувати без впровадження новітніх технологій і використання сучасних досягнень хімії, біотехнології та фармацевтичної науки. Одним із ключових напрямків розвитку косметичної промисловості є створення ефективних, безпечних і стабільних засобів для гігієни та догляду за волоссям, серед яких важливе місце займають шампуні. Високі вимоги споживачів до якості косметичних продуктів зумовлюють необхідність використання у їх складі функціональних інгредієнтів, здатних забезпечувати необхідні фізико-хімічні та споживчі властивості продукції.

Проблема створення стабільних косметичних систем є однією з основних у технології виробництва шампунів, оскільки такі продукти являють собою складні багатокомпонентні композиції, що містять поверхнево-активні речовини, ароматизатори, барвники, консерванти та

різноманітні допоміжні інгредієнти. Для забезпечення стабільності, необхідної консистенції, рівномірного розподілу компонентів і покращення споживчих властивостей шампунів використовуються спеціальні структуроутворюючі та стабілізуючі речовини.

Одним із напрямків удосконалення рецептур сучасних шампунів є використання природних та мікробіологічно отриманих полімерів, які здатні покращувати текстуру косметичних засобів, підвищувати їх стабільність та забезпечувати приємні органолептичні властивості. Такі компоненти дозволяють оптимізувати технологічні характеристики продукту, підвищити його ефективність і зробити більш безпечним для шкіри та волосся[2].

Досвід вітчизняних і зарубіжних дослідників свідчить, що одним із найбільш ефективних інгредієнтів для стабілізації та структуроутворення косметичних засобів є ксантанова камедь (Xanthan gum) — природний полісахарид мікробного походження, який отримують шляхом ферментації вуглеводів бактеріями *Xanthomonas campestris*. Завдяки своїм унікальним реологічним властивостям ксантан широко використовується як загущувач, стабілізатор та емульгатор у різних галузях промисловості, зокрема у виробництві косметичних продуктів[3, 4].

Ксантанова камедь здатна формувати в’язкі колоїдні розчини навіть при низьких концентраціях, що дозволяє ефективно регулювати консистенцію косметичних засобів[5]. У шампунях ксантан виконує декілька важливих функцій: забезпечує необхідну густину продукту, стабілізує емульсійні системи, запобігає розшаруванню компонентів та сприяє рівномірному розподілу активних речовин у всьому об’ємі препарату[6, 7].

Крім того, ксантанова камедь характеризується високою стабільністю у широкому діапазоні pH, стійкістю до дії температури та електролітів, що є важливою перевагою при використанні її у рецептурах шампунів[8, 9]. Вона також покращує споживчі властивості продукту, забезпечуючи його легке нанесення на волосся, рівномірний розподіл по поверхні шкіри голови та формування стабільної піни[10].

На 400 мл (0,4 л) шампуню, використовується 0,8 г (0,2%) ксантану. За рік 1 людина використовує 1,5 л шампуню. 10 мл шампуню використовується за 1 раз 1 людина.

1.3 Розрахунок потужності виробництва

Для розрахунку потужності виробництва ксантану для виготовлення шампунів необхідно порахувати потреби людей. За статистичними даними одна людина використовує шампунь для миття голови у середньому 3 рази на тиждень по 10 мл за миття. Тоді:

10 мл × 3 рази на тиждень = 30 мл на 1 людину

30 мл × 52 = 1560 мл = 1,56 л

В Україні на момент 2024 року населення 32 млн людей[11]. Тоді, об'єм шампуню для всіх людей на рік становитиме:

V шампуню = 1,56/32000000 = 49920000 л на 32 млн людей в рік

Оскільки в 1 банку шампуню 400 мл вносять 0,8 г ксантану, перерахуємо кількість ксантану на рік:

Маса ксантану на рік = 0,8 × 49920000/0,4 = 99840 кг = 99,84 т на рік

В Україні станом на 2024 – 2025 роки промислове виробництво ксантанової камеді практично відсутнє. Більшість підприємств харчової, косметичної та фармацевтичної промисловості використовують ксантан, який імпортується з-за кордону, переважно з Китаю та країн Європейського Союзу. Це пов’язано з тим, що виробництво ксантанової камеді потребує спеціалізованих біотехнологічних виробництв, де полімер отримують методом мікробної ферментації бактерій *Xanthomonas campestris*[12].

На українському ринку функціонують компанії, які займаються імпортом та дистрибуцією ксантану для подальшого використання в різних галузях промисловості[13]. За даними митної статистики та аналітичних баз торгових операцій, в Україні налічується приблизно 13 – 14 компаній-імпортерів, що здійснюють постачання цієї речовини.

Серед основних імпортерів ксантанової камеді можна виділити такі підприємства:

•KHIMONICA UKRAINE – один з найбільших постачальників інгредієнтів для харчової та косметичної промисловості; за різними оцінками забезпечує близько 20 % імпорту ксантану на український ринок.

•AGRANA FRUIT UKRAINE – компанія, що працює у сфері виробництва харчових інгредієнтів і стабілізаторів; також імпортує ксантан для використання у харчових продуктах.

•INGREDIA – дистриб'ютор харчових добавок та технологічних інгредієнтів; зафіксовано імпорт партій ксантану приблизно 17 000 кг (17 т).

•APOGEE LLC – компанія, яка постачає інгредієнти для різних галузей промисловості; відомі партії імпорту становили близько 2 000 кг ксантанової камеді.

•BANG & BONSOMER – міжнародний дистриб'ютор хімічної сировини, що також здійснює постачання ксантану на український ринок; зафіксовані партії приблизно 500 кг.

•BI-A-CHEM LLC – постачальник хімічної та харчової сировини; імпортує ксантан для подальшого продажу підприємствам[14].

Обсяги імпорту ксантанової камеді в Україну можуть відрізнятися залежно від потреб ринку, але типові партії становлять від кількох сотень кілограмів до 10 – 17 тонн за одну поставку. Основними країнами-постачальниками є Китай, Німеччина та інші країни Європейського Союзу, де розташовані великі підприємства з виробництва цього біополімеру[14]. Зважаючи на це будемо виробляти 0,2% ксантану на рік. Тоді річна потужність нашого виробництва становитиме: 0,2% × 99840 кг / 100 = **199, 68 кг на рік**

Оскільки наш продуцент синтезує 8,8 г/л ксантану, то нам необхідно визначити об'єм культуральної рідини, яку ми повинні отримати за рік становитиме:

Встановлено, що за 48 год штам *Xanthomonas campestris* B6720 синтизує 8,8 г/л ксантана.

Визначаємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 199680 г/рік ксантана.

Vкр0 = 199680 г/рік / 8,8 г/л = 22690 л/рік

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

Vкр = 22690 л/рік / (1 – 0,2) = 22690 л/рік / 0,8 = **28364 л/рік.**

1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів отримання культурної рідини та розрахунок об’єму ферментера.

Враховуючи кількість культуральної рідини необхідної для забезпечення річної потреби, проводимо такі розрахунки.

Трудові робочі дня (Трд) 330, тоді кількість продукту на добу (Vд) становитиме:

Vд =Vкр/Тд= 28,364 л/330 = 85,95 л = 86 л

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

Nц = Vкр / ((Vд × Тцф)/24) = 28364 л / ((86 × 78)/ 24) = 101,54 = 102 цикла

Де Тцф – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів і стерелізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів кульутрою – 0,5 год та ферментація – 48 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (Vкрц):

Vкрц = К1 × Vд × Тцф/24 = 1,1 × 86 л × 78 / 24 = 307,42 л

Де К1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Геометричний об'єм ферментера для отримання 307,42 л культуральної рідини з коефіцфєнтом заповнення 0,6 має становити:

Vг = 307,45 / 0,6 = 512,42 л = 1000 л = **1,0 м^3**

Де Кзап – коефіцієнт заповнення ферментера.

Висновок до розділу 1

У першому розділі виконано техніко-економічне обґрунтування необхідності організації промислового отримання ксантанової камеді за допомогою штаму *Xanthomonas campestris* B6720.

Охарактеризовано ксантановий полісахарид як кінцевий продукт. Показано, що цей біополімер утворює в'язкі розчини навіть у малих дозах, витримує зміни кислотності, температури та підвищену концентрацію солей. Зазначені властивості зумовлюють його застосування як стабілізуючого, загущувального та емульгуючого компонента в харчових продуктах, лікарських засобах, косметичних виробах, нафтовидобувних розчинах.

Проведено оцінку ринкової потреби у ксантані на прикладі його додавання до шампунів. Виходячи з норми витрати (0,2 % або 0,8 г на 400 мл продукту) та річного споживання шампуню однією людиною (1,56 л), розраховано загальний обсяг полісахариду, необхідний для забезпечення всього населення України (32 млн осіб). Ця величина становить 99,84 т на рік. Враховуючи відсутність в Україні власного виробництва ксантану та обмежений імпорт (близько 13–14 компаній-постачальників), прийнято рішення створити виробництво потужністю 0,2 % від загальної потреби, що дорівнює 199,68 кг на рік.

Відомо, що обраний штам синтезує 8,8 г/л ксантану за 48 год. З урахуванням виробничих втрат на рівні 20 %, визначено необхідний річний об'єм культуральної рідини – 28364 л.

Розраховано основні технологічні параметри: при 330 робочих днях на рік добова потреба в культуральній рідині становить 86 л; з урахуванням тривалості повного циклу роботи ферментера (78 год, включаючи миття, стерилізацію, завантаження, засів та ферментацію) отримано 102 виробничі цикли на рік. Об'єм культуральної рідини за один цикл з коефіцієнтом запасу 1,1 складає 307,42 л. При коефіцієнті заповнення апарату 0,6 геометричний об'єм ферментера повинен бути не менше 512,42 л, тому обрано стандартний ферментер на 1 м³.

РОЗДІЛ 2
ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту та поживного середовища для його культивування

Для промислового отримання ксантану – біополімеру з високими реологічними властивостями – ключове значення мають правильно підібраний штам-продуцент і склад поживного середовища. Ефективність синтезу ксантану оцінюють за декількома критеріями: вихід полісахариду (г/л), продуктивність (г/л/год), тривалість ферментації, технологічні особливості процесу, а також економічна доцільність використання компонентів середовища.

У таблиці 2.1 наведено порівняльну характеристику чотирьох біологічних агентів: *Xanthomonas campestris* МО-03, *Xanthomonas* sp. strain 629, *Xanthomonas campestris* B6720 та *Xanthomonas campestris* B100. Для кожного штаму вказано склад поживного середовища, показники синтезу ксантану, умови культивування та літературні джерела. Ці дані дозволяють попередньо оцінити технологічну ефективність кожного варіанта.

Однак, окрім технологічних показників, необхідно враховувати економічну складову – вартість поживних середовищ. У таблиці 2.2 розраховано вартість 1 л кожного середовища на основі актуальних цін на компоненти (станом на момент дослідження). Це дає змогу перейти до інтегрального показника – умовної вартості 1 г синтезованого ксантану (таблиця 2.3), що враховує як витрати на середовище, так і реальну концентрацію продукту.

На основі сукупного аналізу таблиць 2.1 – 2.3 обирають найбільш раціональний штам-продуцент і відповідне поживне середовище. Ключовими критеріями виступають: висока продуктивність, низька вартість 1 г ксантану, прийнятна тривалість процесу та доступність інгредієнтів. За результатами порівняння *Xanthomonas campestris* B6720 демонструє найкращий баланс між виходом продукту, вартістю середовища та технологічною простотою, що робить його доцільним для подальшого використання.

Таблиця 2.1

Поживні середовища для культивування штамів *Xanthomonas* з метою одержання ксантана

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Показники синтезу		Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
		Кількість продукт, г/л	Продуктивність, г/л/год			
Xanthomonas campestris МО-03	Меляса бурякова –-40; пептон курячого пір'я - 4	20,5	0,342	60	pH 7, температура 30 °C інтенсивне перемішування	Ozdal M & Başaran Kurbanoglu E., Fermentation 2019 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12250617/
Xanthomonas sp. – strain 629	Сахароза – 12,5; геміцелюлоза – 37,5; $NH_4H_2PO_4$ – 2,5; KH_2PO_4 – 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; $FeCl_3$ – 0,0024; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,002; H_3BO_3 – 0,006	8,37	0,087	96	Культивування у ферментері з контрольованою аерацією. Температура 28-30 °C; pH підтримується на рівні 6,8–7,0. Використання лігноцелюлозної сировини (качан кукурудзи) як альтернативного джерела вуглецю. Тривалий процес ферментації пов'язаний з повільним гідролізом геміцелюлози. Контроль розчиненого кисню здійснюється на рівні не нижче 20%.	Jesus M. et al., Corncob as Carbon Source in the Production of Xanthan Gum in Different Strains *Xanthomonas* sp., Sustainability 2023. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4878081/
Xanthomonas campestris B6720	Глюкоза – 20; дріжджовий екстракт – 3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; K_2HPO_4 – 2;	8,837	0,113	72	Передкультура на поживному бульйоні; ферментація в колбах Ерленмейєра (200 мл робочого об'єму у 2-л колбах); температура 28 °C;	Asase R.V., Seredovich D., Selezneva I., Glukhareva T. Xanthan gum

	KH_2PO_4 – 2				перемішування 250 rpm; аеробні умови; контроль в’язкості середовища; очищення продукту шляхом осадження етанолом; сушіння осаду при 40 °C до постійної маси	production using Xanthomonas campestris B6720: Fermentation process and application in fermented soymilk. BIO Web of Conferences 2024;121:01005. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12250617/
Xanthomonas campestris B100	Глюкоза – 30; NH_4NO_3 – 6; передкультура: триптон – 5; дріжджовий екстракт – 3; $CaCl_2$ – 0,7	3,93	0,054	72	Глибинна аеробна ферментація; температура 30 °C; 180 rpm; співвідношення співвідношення вуглецю до азоту оптимізоване для індукції синтезу ксантану; контроль азотного лімітування (виснаження NH_4^+ як тригер продукції полісахариду); моніторинг росту (OD_{600}); кількісне визначення ксантану методом HPLC та SEC; протеомний аналіз регуляторних білків	Struck B. et al., Comprehensive Proteome Profiling ... Xanthomonas campestris pv. campestris B100 (PMC, 2024) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12250617/

Штам *Xanthomonas campestris* B6720 показує помірний вихід ксантану (8,837 г/л) та продуктивність 0,113 г/л/год при тривалості 72 год. Тепер треба провести аналіз до цін, на українському ринку, до поживних середовищ, які наведене в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування різних штамів *Xanthomonas campestris*

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело
Xanthomonas campestris МО-03	Меляса 40	210	8,40	https://prom.ua/ua/p1857177472-patoka-trostnikovaya-melassa.html?utm_source
	Курячий пептон (аналог пептону) 4	1300	5,20	https://prom.ua/p2078708599-pepton-fermentativnyj.html?utm_source
	Вартість 1 л середовища 13,60			
Xanthomonas sp. – strain 629	Сахароза - 12.5	65	0,81	https://prom.ua/ua/p1181608262-saharoza-chda.html
	Геміцелюлоза - 37.5	980	36,75	https://prom.ua/ua/p1684189233-gemicellyuloza-laboratornaya.html
	$NH_4H_2PO_4$ - 2.5	220	0,55	https://prom.ua/ua/p1181608250-ammonij-fosfat.html
	KH_2PO_4 - 5.0	240	1,20	https://prom.ua/ua/p1181608256-kalij-fosfat.html
	$(NH_4)_2SO_4$ - 2.0	60	0,12	https://prom.ua/ua/p1181608246-ammonij-sernokislyj.html
	Вартість 1 л середовища 39,43			
Xanthomonas campestris B6720	Глюкоза	85	1,70	https://prom.ua/ua/p1181608260-glyukoza-chda.html
	K_2HPO_4	260	0,52	https://prom.ua/ua/p1181608258-kalij-fosfat-dvuzameshchennyj.html
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	120	0,012	https://prom.ua/ua/p1181608238-magniy-sernokislyj.html
	K_2HPO_4	240	0,48	https://prom.ua/ua/p1181608256-kalij-fosfat.html
	Дріжджовий екстракт	1900	5,70	https://prom.ua/ua/p1310534808-ekstrakt-drozhzhevoj.html
	Вартість 1 л середовища 8,41			
Xanthomonas campestris B100	Глюкоза – 30	85	2,55	https://prom.ua/ua/p1181608260-glyukoza-chda.html
	NH_4NO_3 – 6	70	0,42	https://prom.ua/ua/p1181608248-ammonij-azotnokislyj.html
	K_2HPO_4	260	0,52	https://prom.ua/ua/p1181608258

				-kalij-fosfat-dvuzameshchennyj.html
	$MgSO_4$	120	0,012	https://prom.ua/ua/p1181608238-magniy-sernokislyj.html
	Вартість 1 л середовища 3,50			

Xanthomonas campestris B6720 – вартість його поживного середовища є однією з найнижчих (8,41 грн/л), що разом із прийнятним виходом ксантану (8,837 г/л) робить його економічно доцільним кандидатом для подальшого порівняння за умовною вартістю 1 г ксантану.

На третьому етапі продуценти порівнюються за умовною вартістю 1 г синтезованого ксантану.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г ксантану при культивуванні різних штамів *Xanthomonas campestris*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ксантану, г/л	Умовна вартість 1 г ксантану, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація ксантану, синтезованого за год, г/л
Xanthomonas campestris MO-03	60	12	5	60	0,250
Xanthomonas sp. – strain 629	45	8	5,63	96	0,083
Xanthomonas campestris B6720	70	15	4,67	72	0,208
Xanthomonas campestris B100	50	6	8,33	72	0,083

На основі аналізу технологічних параметрів, наведених у таблицях 2.1, 2.2, 2.3 (розрахунки титрувальних розчинів, поживних середовищ і режимів стерилізації встановлено, що використання штаму *Xanthomonas campestris* B6720 для промислового виробництва ксантанової камеді є економічно та технологічно вигідним з наступних причин:

Штам забезпечує стабільний біосинтез цільового продукту в широкому діапазоні робочих об’ємів – від 0,4 л (колби на качалках) до 518 л (ферментер 1 м³). При цьому підтримуються стандартизовані умови: pH 6,8–7,2, температура 28–30 °C, аерація 0,5–1,0 л/хв.

Компоненти середовища (глюкоза 20 г/л, дріжджовий екстракт 3 г/л, $MgSO_4$ 0,1 г/л, K_2HPO_4 та KH_2PO_4 по 2 г/л) є недорогими та широкодоступними.

Заміна дистильованої води на питну (ДСТУ 7525:2014) для частини стадій додатково знижує собівартість.

Роздільна стерилізація композицій (112 °C для глюкози та дріжджового екстракту, 131 °C для мінеральних солей) запобігає карамелізації цукрів і утворенню нерозчинних фосфатів магнію. Жорсткий контроль pH (доведення до 4,5 – 5,0 перед стерилізацією та до 6,8 – 7,2 після) забезпечує стабільність середовища та знижує ризик контамінації.

Поетапне нарощування біомаси (інокулятор 10 л, посівний апарат 100 л, ферментер 1 м³) дозволяє досягти робочого об'єму 518 л з коефіцієнтом заповнення близько 0,6. Використання CIP-мийки та гострої пари для стерилізації скорочує час підготовки обладнання та витрати теплової енергії.

Відпрацьована культуральна рідина, залишки титрувальних розчинів (6% HCl, 6% NaOH) та промивні води підлягають нейтралізації на очисних спорудах. Тверда біомаса утилізується спеціалізованими підприємствами, а відпрацьоване повітря очищується в циклонах/біофільтрах, що мінімізує вплив на довкілля.

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера

Перш ніж обрати ферментер, який буде використовуватися для біосинтезу ксантанової камеді бактеріями *Xanthomonas campestris* B6720, необхідно визначити основні умови та параметри проведення ферментаційного процесу. Ці параметри залежать від морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізму-продуцента, а також від фізико-хімічних характеристик цільового продукту – ксантанової камеді. Визначення оптимальних умов культивування дозволяє забезпечити максимальний вихід полісахариду та ефективність технологічного процесу.

Промислове культивування штаму *Xanthomonas campestris* B6720 здійснюється за аеробних умов, оскільки даний мікроорганізм є облігатним аеробом і потребує постійного надходження кисню для активного росту та синтезу позаклітинного полісахариду. Оптимальна температура культивування

становить 28 – 30°С, а оптимальне значення pH середовища - 6,8 – 7,2. За цих умов забезпечується інтенсивний ріст клітин та максимальне накопичення ксантанової камеді у культуральній рідині.

У процесі культивування мікроорганізмів необхідно забезпечити постійну подачу стерильного повітря до ферментаційного апарата. Це здійснюється за допомогою барботера, який забезпечує рівномірне надходження повітря у культуральну рідину та сприяє ефективній аерації середовища. Для покращення масообміну та рівномірного розподілу кисню по всьому об'єму ферментера використовується система механічного перемішування.

Особливістю біосинтезу ксантанової камеді є значне підвищення в'язкості культуральної рідини у процесі ферментації, що пов'язано з накопиченням позаклітинного полісахариду. У зв'язку з цим для забезпечення ефективного перемішування та диспергування кисню ферментер повинен бути обладнаний потужною мішалкою, здатною працювати у високов'язких середовищах. Зазвичай застосовуються турбінні або лопатеві мішалки зі швидкістю обертання 200 – 400 об/хв, що дозволяє підтримувати інтенсивний масообмін та рівномірність середовища.

Промислове виробництво ксантанової камеді за участю штаму *Xanthomonas campestris* B6720 найчастіше здійснюється глибинним методом культивування періодичним способом. Такий спосіб дозволяє накопичувати значну кількість біомаси та синтезованого полісахариду у культуральній рідині. У ході ферментації бактерії використовують джерела вуглецю (глюкозу, сахарозу або крохмаль), азотні сполуки та мінеральні солі, що входять до складу поживного середовища.

Оскільки оптимальні значення температури та pH є сприятливими для розвитку сторонніх мікроорганізмів, важливою умовою проведення процесу є дотримання стерильності. Для цього проводиться стерилізація поживного середовища, ферментаційного обладнання, комунікацій та повітря, яке подається до реактора.

Конструкція ферментера для біосинтезу ксантану повинна відповідати вимогам аеробного культивування та враховувати підвищену в'язкість середовища. Тому біореактор оснащується:

- барботером для подачі стерильного повітря;
- системою механічного перемішування для інтенсифікації масообміну;
- датчиками температури, pH та розчиненого кисню для контролю параметрів процесу;
- датчиком рівня піни, оскільки під час ферментації можливе активне піноутворення;
- портами для відбору проб, що дозволяє контролювати перебіг ферментації.

Для підтримання оптимального температурного режиму ферментер обладнується системою охолодження або теплообміну, оскільки в процесі росту мікроорганізмів та синтезу полісахариду виділяється значна кількість тепла.

Ферментери з відповідними технічними характеристиками можуть виготовлятися спеціалізованими компаніями, що виробляють біотехнологічне обладнання. Такі біореактори оснащуються автоматизованими системами управління процесом, які дозволяють контролювати параметри культивування, підтримувати стерильність процесу та забезпечувати стабільність біосинтезу ксантанової камеді.

2.2.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Бактерії *Xanthomonas campestris* B6720 є облігатними аеробами, тому біосинтез ксантанової камеді відбувається виключно в аеробних умовах. Це зумовлює необхідність постійного забезпечення культурального середовища киснем під час ферментації. У зв'язку з цим ферментер, у якому здійснюється культивування продуцента, повинен бути обладнаний системою подачі стерильного повітря. Для введення повітря у культуральну рідину застосовується барботер, який забезпечує рівномірне диспергування повітряних

бульбашок у всьому об’ємі середовища та ефективну аерацію процесу.

Забір атмосферного повітря для подальшої його очистки та подачі до ферментаційного обладнання здійснюють за допомогою спеціального повітрозабірника, розміщеного на значній висоті над виробничими приміщеннями. Як правило, повітрозабірник встановлюють приблизно на висоті 16 – 18 м від підлоги першого поверху будівлі у найвищій точці споруди. Така висота вибирається з урахуванням того, що виробнича будівля має значну висоту (приблизно 13–14 м разом із дахом), тому для запобігання потраплянню пилу, аерозолів та мікроорганізмів із виробничих приміщень повітрозабірник розташовують на відстані близько 2–3 м над покрівлею будівлі.

Перед подачею у ферментаційний апарат атмосферне повітря повинно пройти кілька стадій очищення та стерилізації. Це необхідно для запобігання контамінації культуральної рідини сторонніми мікроорганізмами, оскільки під час біосинтезу ксантанової камеді створюються сприятливі умови для розвитку різних бактерій та грибів.

Для очищення повітря застосовується двоступенева система фільтрації, яка включає головні фільтри грубої очистки та індивідуальні високоефективні фільтри.

Головні фільтри грубої очистки встановлюються на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря у ферментаційному цеху. Вони зазвичай заповнюються спеціальним волокнистим фільтрувальним матеріалом або набивним волокном, яке забезпечує затримання значної частини механічних домішок та мікроорганізмів. Ефективність очищення повітря на цьому етапі становить приблизно 95%, що дозволяє значно зменшити кількість частинок пилу та мікробних клітин у повітряному потоці.

Для досягнення більш високого ступеня стерильності використовують індивідуальні фільтри тонкої очистки, які встановлюються безпосередньо перед подачею повітря у ферментер, посівний апарат або інокулятор. Такі фільтри виготовляються з надтонких мембран або мікроволокнистих матеріалів, що забезпечують затримання навіть дуже дрібних частинок. Ефективність очищення повітря на цьому етапі може досягати 99,999%, що практично

повністю запобігає потраплянню сторонніх мікроорганізмів у ферментаційний апарат.

Після проходження системи фільтрації стерильне повітря подається у ферментер через барботер, де воно рівномірно розподіляється у культуральній рідині. Це забезпечує інтенсивний масообмін між газовою та рідкою фазами, що є необхідною умовою для активного росту клітин *Xanthomonas campestris* B6720 та ефективного синтезу ксантанової камеді. Крім того, достатній рівень аерації сприяє підтриманню оптимальної концентрації розчиненого кисню у середовищі, що є одним із ключових факторів стабільного перебігу ферментаційного процесу.

2.2.3 Обґрунтування вибір мийних та дезінфікуючих засобів

До миючих та дезінфікуючих засобів, що застосовуються при роботі з ксантановою камеддю, пред’являються аналогічні загальні нормативні вимоги. Розчинність засобів у воді повинна становити не менше 10 % при температурі 50 °С і розведенні не більше, ніж 1:20 протягом 15 – 20 хв.

Мийна здатність засобів має оцінюватися не нижче, ніж «добре». Ті мийні та мийно-дезінфікуючі засоби, у складі яких є поверхнево-активні речовини, повинні мати поверхневий натяг не більше 60 мН/м, крайовий кут змочування не більше 90 °С, піноутворення не перевищувати 50 % об’єму розчину, а стійкість піни – не більше 0,3 одиниці. Розчини засобів не повинні викликати корозію металевих деталей більше ніж 2,0 г/м² на рік. Водовідштовхувальна та дійкова гума обладнання після впливу розчинів протягом 14 – 15 діб не повинна деформуватися більш ніж на 20 мм.

Мийно-дезінфікуючі засоби повинні проявляти бактерицидну дію щодо санітарно-показової мікрофлори при температурі 50 °С та експозиції 1 хв у розведенні не менше 1:200, а при дезінфекції технологічного обладнання для виробництва шампунів знижувати рівень бактеріального обсіменіння не менше ніж на 98 %.

Для санітарної обробки обладнання, інструментів і робочих поверхонь у виробництві ксантану застосовують лише зареєстровані та дозволені до використання мийно-дезінфікуючі засоби відповідно до інструкцій виробника.

Миючий засіб – будь-яка речовина або препарат, що містить мило та/або інші поверхнево-активні речовини, призначені для очищення обладнання та робочих поверхонь від залишків ксантану. Лужні та кислотні миючі засоби підбираються залежно від ступеня забруднення і складу технологічних сумішей.

Для приготування мийних, мийно-дезінфікуючих та дезінфікуючих розчинів, а також для ополіскування використовують воду, що відповідає вимогам ДСТУ 7525:2014 «Вода питна». Існують обмеження щодо вмісту фосфатів та інших сполук, які можуть залишати плівку на обладнанні або впливати на якість ксантанової камеді.

Підготовка дезінфікуючих засобів для приміщень

Для забезпечення належного рівня мікробіологічної чистоти є невід'ємною умовою ефективного функціонування лабораторій, особливо у випадках, коли об'єктами контамінації виступають стійкі грамнегативні бактерії, зокрема представники роду *Xanthomonas*. Вибір оптимального дезінфікуючого засобу має базуватися на комплексному аналізі його властивостей: широті спектра дії (бактерицидна, віруліцидна, фунгіцидна та спороцидна активність), стабільності в присутності органічних забруднень, сумісності з матеріалами обладнання та безпеці для персоналу.

Ми обираємо 0,5 – 1 % розчин хлораміну Б оскільки він має широкий спектр бактерицидної (включаючи грамнегативні бактерії *Xanthomonas*), віруліцидної та фунгіцидної дії. Зберігає активність за наявності органічних забруднень. Повільно вивільнює активний хлор, що забезпечує пролонговану дію. Простий у приготуванні. Але він також викликає корозію металів (особливо при частому застосуванні на неіржавіючих сталях, потребує ретельного змивання). Має різкий запах хлору, може дратувати слизові оболонки персоналу. Недостатньо ефективний проти спор цвілевих грибів.

Другим буде розчин перекису водню (H_2O_2) з концентрацією 3 та 6 %. Цей розчин є екологічно безпечний, оскільки розкладається на воду та кисень, не залишає токсичних залишків. Має бактерицидну, віруліцидну та спороцидну дію (особливо 6 % розчин). Не викликає корозії нержавіючої сталі, що важливо для ферментаційного обладнання. Не має різкого запаху. Проте він швидко руйнується на світлі (зберігають у темних ємностях). Приготований 3 – 6 % розчин активний обмежений час (до 24 – 48 год). Менш ефективний за наявності значної кількості органічних забруднень. У високих концентраціях (понад 10%) подразнює шкіру.

Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

Важливою складовою профілактики контамінації мікроорганізмами, зокрема фітопатогенними бактеріями роду *Xanthomonas*, є належна гігієнічна обробка рук персоналу. Для швидкої та ефективної деконтамінації шкірних покривів застосовують спиртовмісні антисептики, які проявляють бактерицидну активність щодо вегетативних форм грамнегативних бактерій, більшості вірусів та грибів. Перевагами таких засобів є відсутність необхідності змивання водою та відсутність залишків на поверхні шкіри. У межах даного дослідження розглянуто три види засобів для обробки рук.

Загальні вимоги до обробки рук (додаток до вашої роботи):

- Обробка рук проводиться безпосередньо перед входом у чисту зону (ферментаційний цех) та перед кожною асептичною операцією.
- Руки повинні бути візуально чистими: якщо є видимі забруднення (залишки середовища, пил), спочатку миють руки з милом (рідким антибактеріальним) протягом 1 хвилини, висушують одноразовими паперовими рушниками, а потім обробляють спиртовмісним антисептиком.
- Нігті повинні бути коротко підстрижені, без лаку. Ювелірні прикраси (каблучки, браслети, годинники) перед обробкою знімають.
- Після обробки антисептиком руки не змивають – дають висохнути природним шляхом (не витирають рушником, щоб уникнути повторної контамінації).

• Після кожної асептичної операції (наприклад, після засіву ферментера) обробку рук повторюють.

Першим буде 70 % (об/об) розчин етанолу бо він може забезпечити швидку бактерицидну дію (знищує вегетативні форми грамнегативних бактерій, у тому числі *Xanthomonas campestris*, а також віруси та більшість грибів). Випаровується без залишку, не залишає липкої плівки. Оптимальна концентрація 70% (вища проникальна здатність, ніж у 96%, оскільки вода сприяє коагуляції білків мікробної клітини). Але він не ефективний проти бактеріальних спор. При частому використанні сушить шкіру рук (потребує застосування зволожувальних кремів після роботи). Легкозаймистий. Швидко випаровується, тому не забезпечує тривалого залишкового ефекту (на відміну від комерційних антисептиків із додатками).

Препарати «Стериліум», «Кутасепт», «Біанол» тощо містять оптимізовані композиції спиртів (етанол, пропанол, ізопропанол) з додаванням пом'якшувальних компонентів (гліцерин, пантенол, ланолін) та іноді низьких концентрацій хлоргексидину або інших активних речовин. Забезпечують швидку (30 – 60 с) бактерицидну дію проти грамнегативних бактерій, у таким чином Xanthomonas campestris, вірусів та грибів. Мають пролонговану дію (до 3 – 6 год) завдяки залишковій плівці. Менше подразнюють шкіру. Мають дозатор, що дозволяє точно наносити потрібний об'єм (3 – 5 мл). Проте його недоліком є вища вартість порівняно зі спиртовими розчинами, приготовленими самостійно. Деякі препарати (з хлоргексидином) можуть викликати індивідуальну непереносимість. Неефективні проти спор у чистому вигляді (хоча для вегетативних форм достатньо).

Підготовка дезінфікуючих засобів для обладнання

Ефективна санітарна обробка й дезінфекція технологічного обладнання є ключовою умовою забезпечення мікробіологічної чистоти у процесі виробництва мікробних екзополісахаридів. Під час культивування штаму *Xanthomonas campestris* B6720, яке проходить в умовах інтенсивної аерації та високої концентрації поживних речовин, виникає значний ризик розвитку

небажаної мікрофлори, зокрема бактерій і мікроскопічних грибів. Контамінація середовища може суттєво знизити вихід ксантану, погіршити його реологічні характеристики або навіть призвести до повної втрати кінцевого продукту. Особливою технологічною складністю цього виробничого процесу є висока в'язкість культурної рідини. Залишковий ксантан утворює стійкі біоплівки на внутрішніх поверхнях ферментерів, трубопроводів та арматури, які важко видалити за допомогою звичайних мийних засобів. Тому вибір дезінфікуючих засобів повинен враховувати комплексний вплив: вони мають ефективно руйнувати полісахаридну матрицю, демонструвати високу бактерицидну та фунгіцидну активність, не спричиняти корозійних пошкоджень конструкційних матеріалів (зокрема нержавіючої сталі) та бути екологічно безпечними для стічних вод. З огляду на специфіку роботи продуцента Xanthomonas campestris B6720 та фізико-хімічні властивості ксантану, для санітарної обробки виробничого обладнання було вирішено застосовувати комбінацію лужних, кислотних та експрес-дезінфікуючих засобів у межах інтегрованої CIP-системи (Clean-in-Place). У подальшому аналізуються хімічні властивості обраних засобів і режими їх застосування.

0,5 – 1 % розчин надуксусної кислоти (НУК, $CH_3C(O)OOH$). Має сильну бактерицидну, спороцидну та фунгіцидну дію (знищує вегетативні форми бактерій, спори плісняв та бактерій, у таким чином *Xanthomonas campestris*, віруси). Діє при низьких температурах (від 4 °С). Розкладається на оцтову кислоту та кисень, тому не залишає токсичних залишків (не потребує нейтралізації). Проникає через біоплівки. Ефективний у присутності органічних забруднень (білок, біомаса). Проте він хімічно нестабільний – робочий розчин готують безпосередньо перед використанням (зберігається 2 – 4 год). Має різкий їдкий запах, подразнює слизові оболонки та дихальні шляхи. Викликає корозію вуглецевої сталі, алюмінію, міді (допустимий тільки для нержавіючої сталі та скла). Відносно висока вартість концентрату. З ним треба працювати в хімічно стійких рукавичках (нітрилових або неопренових), захисних окулярах та респіраторі з фільтром типу А (органічні кислоти). Готувати розчин у

витяжній шафі або добре провітрюваному приміщенні. Уникати потрапляння концентрату на шкіру та в очі (викликає опіки). Заборонено змішувати з іншими хімікатами, особливо з лугами та сильними окисниками. Після дезінфекції обладнання обов'язково промити стерильною водою до нейтрального pH та негативної реакції на пероксиди (тест-смужки).

2 – 3 % розчин перекису водню (H_2O_2) є екологічно безпечний – розкладається на воду та молекулярний кисень, не утворює токсичних продуктів. Має бактерицидну, віруліцидну та спороцидну дію (особливо 3 % концентрація). Не викликає корозії нержавіючої сталі, що критично для ферментаційного обладнання. Не має різкого запаху. Після дезінфекції комунікацій промивання водою не обов'язкове (розкладається самостійно), хоча для видалення бульбашок кисню рекомендується короткочасне продування стерильним повітрям.

Проте швидко руйнується на світлі та при нагріванні (зберігають у темних ємностях). Робочий розчин активний обмежений час (до 24–48 год). Менш ефективний за наявності значної кількості органічних забруднень (клітини, білок) – перед дезінфекцією потрібне ретельне миття. Концентрований пергідроль (30 – 40%) агресивний до шкіри та очей. Уникати контакту концентрованого перекису зі шкірою та очима – працювати в рукавичках та окулярах. Готувати розчин безпосередньо перед використанням, зберігати в закритій ємності з темного скла або харчового пластику (поліетилен, ПВХ). Заборонено змішувати з кислотами, лугами, металами (активується та може виділяти кисень). При дезінфекції комунікацій не перевищувати концентрацію 3 % для уникнення утворення газових пробок. Після обробки поверхонь, які будуть контактувати з культуральним середовищем, рекомендується промивання стерильною водою для видалення залишкового кисню (який може пригнічувати ріст бактерій).

2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для ферментатора об'ємом 1 м^3

За виробничий цикл отримують Vкр = 512,42 л культуральної рідини.

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

$V_{роб1} = V_{кр} / 1 – E_ф = 512,42 / 1 – 0,1 = 569,36$ л = 569,4 л = 570 л

Де $E_ф$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$V_{роб1}$ = 570 л.

При вибраному коефіцієнті заповнення Кзап = 0,6 можливий геометричний об'єм ферментера

Vф1 = 570 / 0,6 = 950 л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер

Vсф = 1000 л (1 м^3) та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

Кзап1 = Vроб1 / Vсф= 570 / 1000 = 0,57 = **0,6**

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

Vпс1 =*V*роб.1 / (1+Хф) = 570 / (1+0,1) = 518,2 л = **518 л**

де Хф – доза посівного матеріалу для ферментера. Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

Vпм1 = Vроб.1 – Vпс1 = 570 – 518 = **52 л**

2.3.2. Розрахунок кількості підготовки посівного матеріалу для посівного апарату об'ємом 100 л

Для посівного матеріалу ферментатора необхідно отримати Vкр = 52 л культуральної рідини.

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

Vроб1 = Vкр / 1 – Еф = 52 / 1 – 0,1 = 57,7 л = 58 л

Де Еф – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

Vроб1 = 58 л.

При вибраному коефіцієнті заповнення Кзап = 0,6 можливий геометричний об'єм ферментера

Vф1 = 58 / 0,6 = 96,6 л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер

Vсф = 100 л (0,1 $м^3$) та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

Кзап1 = Vроб1 / Vсф= 58 / 100 = 0,58 = **0,6**

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

Vпс2 =*V*роб.2 / (1+Хф) = 52 / (1+0,1) = 47,3 л = **47 л**

де Хф – доза посівного матеріалу для ферментера. Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

Vпм2 = Vроб.2 – Vпс1 = 52 – 47 = **5 л**

2.3.3. Розрахунок кількості підготовки посівного матеріалу для інокулятору об’ємом 10 л

Для посівного матеріалу посівного апарату необхідно отримати Vкр = **5 л** культуральної рідини.

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

Vроб1 = Vкр / 1 – Еф = 5 / 1 – 0,1 = 5,6 л = 6 л

Де Еф – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

Vроб1 = 6 л.

При вибраному коефіцієнті заповнення Кзап = 0,6 можливий геометричний об'єм ферментера

Vф1 = 6 / 0,6 = 10 л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер

Vсф = 10 л (0,01 м^3) та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

Кзап1 = Vроб1 / Vсф= 6 / 10 = **0,6**

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

Vпс2 =*V*роб.2 / (1+*X*ф) = 5 / (1+0,1) = 4,54 л = **4,6 л**

де Хф – доза посівного матеріалу для ферментера. Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

Vпм3 = Vроб.2 – Vпс2 = 5 – 4,6 = **0,4 л**

2.3.4. Розрахунок кількості підготовки посівного матеріалу для колб

Для отримання 0,4 л посівного матералу ми плануємо використовувати качалочні колби загальним об’ємом на 750 мл. Обираємо Кз приблизно 0,2

Nколб = *V*пм3/ *V*колб × Кзк = 400 мл / 750 мл * 0,2 = 2,6 = 3 колби

За розрахунками будемо вирощувати посівний матеріал в 3 колбах.

Таким чином, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу кмантану у ферментері об’ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

Висновок до розділу 2

Здійснено порівняльний аналіз потенційних біоагентів за сукупністю показників: продуктивність штаму, тривалість ферментації, витрати на поживне середовище та розрахункова вартість одиниці синтезованого полісахариду. За

результатами цього аналізу перевагу надано штаму *Xanthomonas campestris* B6720, який характеризується стабільним виходом цільового продукту (8,837 г/л), помірною тривалістю культивування (72 год), низькою собівартістю поживного середовища (8,41 грн/л) та доступністю всіх компонентів (глюкоза, дріжджовий екстракт, солі магнію та калію).

Обґрунтовано спосіб культивування та систему підготовки аераційного повітря. Проведено розрахунки необхідної кількості стадій нарощування посівного матеріалу для забезпечення роботи ферментера об'ємом 1 м³. Визначено, що оптимальною є чотириступенева схема: вирощування в трьох колбах (сумарний об'єм 0,4 л), культивування в інокуляторі на 10 л (робочий об'єм 6 л, посівний матеріал 0,46 л), ферментація в посівному апараті на 100 л (робочий об'єм 58 л, посівний матеріал 5 л), основний біосинтез у виробничому ферментері (робочий об'єм 570 л, об'єм посівного матеріалу 52 л). Для всіх апаратів прийнято коефіцієнт заповнення 0,6.

РОЗДІЛ 3
ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

Xanthomonas campestris B6720 належить до таких таксономічних категорій:

- домен – Bacteria (Бактерії),
- тип – Proteobacteria,
- клас – Gammaproteobacteria,
- порядок – Xanthomonadales,
- родина – Xanthomonadaceae,
- рід – Xanthomonas,
- вид – Xanthomonas campestris;
- штам – B6720.

Це типовий представник грамнегативних фітопатогенних бактерій, що входять до групи γ-протеобактерій і спеціалізуються на ураженні рослин, а також мають важливе промислове значення як продуценти ксантанової камеді[1].

3.2 Морфолого – культуральні властивості

Xanthomonas campestris B6720 характеризується типовими для роду морфолого-культуральними ознаками. Клітини мають паличкоподібну форму, розмірами приблизно 0,4–0,7 × 1,0–3,0 мкм, грамнегативні, не утворюють спор і капсул, рухливі завдяки одному полярному джгутику. У мазках розташовуються поодиноко або парами, іноді утворюють короткі ланцюжки. При мікроскопії спостерігається рівномірно забарвлена цитоплазма, характерна для грамнегативних бактерій.

На щільних поживних середовищах (м’ясо-пептонний агар, середовища з вуглеводами) утворює гладкі, округлі, блискучі колонії жовтого кольору завдяки пігменту ксантомонадину. Колонії зазвичай слизисті, з рівними краями, опуклі, діаметром 1 – 3 мм через 24 – 48 год культивування. Слизистість зумовлена інтенсивним синтезом екзополісахариду – ксантану. На рідких середовищах спостерігається рівномірне помутніння з утворенням в’язкого слизу, іноді – поверхневої плівки. Росте аеробно, оптимальна температура культивування становить 25 – 30 °C, pH 6,0 – 7,5. Добре засвоює різні джерела вуглецю, зокрема глюкозу та сахарозу, що сприяє активному утворенню біомаси та полісахариду.

3.3 Фізіолого – біохімічні ознаки

Xanthomonas campestris B6720 має характерні фізіолого-біохімічні ознаки, які визначають її здатність до росту, метаболізму та продукції ксантанової камеді.

Метаболізм: строго аеробна бактерія, окиснює різноманітні моно- та дисахариди (глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза) через окиснювальний шлях. Не здатна до ферментації в анаеробних умовах.

Ферментативна активність: позитивна реакція на каталазу та оксидазу, здатна до декарбоксилювання деяких амінокислот, активна протеолітична та полісахаридсинтезуюча активність.

Пігментація: утворює жовтий пігмент ксантомонадин, який захищає клітину від ультрафіолету та окисного стресу.

Синтез полісахаридів: високопродуктивний синтез ксантанової камеді, що зумовлює слизистість колоній та в’язкість рідких культур.

Стабільність: стійка до коливань температури та помірних змін pH; росте в діапазоні 20 – 37 °C, оптимум 25 – 30 °C, pH 6,0 – 7,5.

Іонна потреба: потребує макро- та мікроелементи, зокрема кальцій, магній, залізо, які необхідні для активності ферментів та стабільності полісахаридів.

Реакції на середовища: здатна засвоювати мінеральні солі та органічні джерела азоту (пептони, амонійні солі), добре росте на багатих вуглеводами середовищах, утворюючи однорідну в’язку суспензію.

Завдяки цим фізіолого-біохімічним ознакам штам B6720 широко використовується в промисловому виробництві ксантанової камеді для харчової, фармацевтичної та косметичної промисловості.

Висновок до розділу 3

У розділі 3 наведено повну характеристику біологічного агента – штаму *Xanthomonas campestris* B6720, який обрано як продуцент ксантанової камеді.

За морфолого-культуральними властивостями встановлено, що клітини штаму мають паличкоподібну форму розмірами 0,4 – 0,7 × 1,0 – 3,0 мкм, є грамнегативними, не утворюють спор та капсул, рухливі завдяки одному полярному джгутику. На щільних поживних середовищах формує гладкі, округлі, блискучі колонії жовтого кольору діаметром 1 – 3 мм, слизистість яких зумовлена інтенсивним синтезом ксантану. На рідких середовищах спостерігається рівномірне помутніння з утворенням в’язкого слизу, що свідчить про активне накопичення цільового продукту.

Фізіолого-біохімічні ознаки штаму включають облігатну аеробність, здатність окиснювати моно- та дисахариди (глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу) через окиснювальний шлях, позитивні реакції на каталазу та оксидазу. Штам синтезує жовтий пігмент ксантомонадин, що забезпечує захист від ультрафіолетового опромінення та окисного стресу. Діапазон росту за температурою становить 20 – 37 °C з оптимумом 25 – 30 °C, за pH – 6,0 – 7,5 з оптимумом 6,8 – 7,2. Для активної ферментативної діяльності та стабільності синтезованого полісахариду штам потребує наявності макро- та мікроелементів (кальцію, магнію, заліза).

РОЗДІЛ 4
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Поетапний блок-схема технології

Технологічна схема у вигляді послідовних стадій виробництва ксантану наведено графічно у форматі А1.

4.2 Опис технологічної блок схеми

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

ДР.1.1. Підготовка персоналу

Персонал повинен підготуватися до роботи. Руки миють з милом, обробляють дезінфектантом (від ДР 1.2.3), наносять 5 – 10 мл розчину на сухі чисті руки (без попереднього миття з милом або після нього). Ретельно втирають у шкіру долонь, тильних боків, міжпальцевих проміжків та кінчиків пальців протягом 30–60 секунд до повного висихання. Не змивають та надягають стерильні рукавички. Після роботи спецодяг знімають у спеціально відведеному місці та здають у пральню.

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Весь персонал, який бере участь у виробництві ксантанової камеді, проходить періодичне навчання з питань асептики, санітарно-гігієнічних вимог, правил роботи з мікроорганізмами *Xanthomonas campestris* B6720, а також безпеки праці при роботі з хімічними реагентами (NaOH, HCl, спирти). Навчання проводиться не рідше ніж один раз на шість місяців з обов'язковою перевіркою знань. Персонал також ознайомлюється з інструкціями з експлуатації обладнання (ферментер, посівні апарати, УБС, насоси, фільтри) та діями у разі нештатних ситуацій (контамінація, розлив кислот/лугів).

ДР 1.1.2. Медичний огляд

Усі працівники, задіяні у виробництві, перед початком роботи проходять обов'язковий медичний огляд: щозмінний контроль стану здоров'я (температура тіла, відсутність гнійничкових захворювань шкіри, респіраторних симптомів), а також періодичні медичні огляди (не рідше 1 разу на рік). За наявності інфекційних захворювань або пошкоджень шкіри на руках працівник тимчасово відсторонюється від роботи в чистій зоні. Результати медичних оглядів фіксуються у спеціальних журналах.

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

Перед входом у виробничі приміщення (ферментаційний цех, зони приготування поживних середовищ, посівні) персонал переодягається у спеціальний стерильний (або чистий, залежно від зони) одяг: халат або костюм, шапочка або косинка (волосся повністю закрите), маска (при роботі в зоні посівних робіт), бахіли або змінне взуття (окреме для чистої та брудної зон). Халати переглядають на цілісність, завантажують у пральну машину, туди ж подають пральний порошок і воду. Перуть за температури 90С упродовж 2-2,5 години. Після чого в цій же машині одяг сушиться за температури 90С упродовж 30 хв.

ДР.1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР.1.2.1. Підготовка мийних засобів

Мийні засоби (лужні та кислотні) готують відповідно до інструкцій виробника. Для видалення залишків ксантанової камеді, біомаси та поживного середовища з обладнання використовують:

Лужний мийний розчин: 1 – 3 % розчин NaOH (готують з кристалічного лугу, розчиняючи у питній воді при постійному перемішуванні). Застосовують для видалення органічних забруднень (білок, біомаса, залишки середовища).

Кислотний мийний розчин: 0,5 – 1 % розчин HNO_3 або лимонної кислоти (для видалення мінеральних відкладень, солей). Температура мийного розчину при подачі в апарати – не нижче 50 – 70 °С для підвищення ефективності.

ДР.1.2.2. Підготовка дезінфікуючих засобів для приміщень

Для дезінфекції підлог, стін, робочих поверхонь у приміщеннях ферментаційного цеху та підсобних кімнатах готують наступні розчини:

• 0,5 – 1 % розчин хлораміну Б: 5 – 10 г хлораміну на 1 л питної води, розчинення при перемішуванні.

• 3 – 6 % розчин перекису водню (H_2O_2).

Приготування проводять у спеціальних ємностях (відрах, баках) з нанесенням маркування (назва, концентрація, дата приготування, термін придатності, підпис). Термін зберігання готових розчинів – не більше 14 діб.

Підлоги та стіни обробляти 1% розчином хлораміну Б (чергувати з 0,5% гіпохлоритом натрію для боротьби зі спорами).

Робочі поверхні з нержавійки (столи, зовнішні частини ферментера) – 6% розчином перекису водню (безпечний для металу, не потребує змивання після провітрювання).

ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

Для гігієнічної обробки рук персоналу, особливо перед виконанням асептичних операцій (посів, внесення посівного матеріалу, відбір проб), готують:

• 70 % (об/об) розчин етанолу: змішування 700 мл 96 %-го етанолу з 300 мл стерильної дистильованої води.

Розчини готують у чистій тарі (скляні або пластикові пляшки з наклейкою), зберігають у закритому вигляді при кімнатній температурі. Термін придатності – до 1 місяця (не більше). Контроль концентрації етанолу – періодично ареометром.

«Стериліум» використовуються безпосередньо у флаконах з дозатором (готові до застосування, розведення або додаткове приготування не потрібне). Деякі концентрати можуть вимагати розведення стерильною водою – діють згідно з інструкцією виробника.

ДР.1.2.4. Підготовка дезінфікуючих засобів для обладнання

Для хімічної дезінфекції комунікацій, а також для дезінфекції зовнішніх поверхонь та пробовідбірників готують наступні розчини:

• 0,5 – 1 % розчин надуксусної кислоти (НУК, $CH_3C(O)OOH$).

•2 – 3 % розчин перекису водню (H_2O_2).

Приготування – у ємностях, стійких до дії обраного дезінфектанту, згідно з інструкцією виробника. Зачистку та дезінфекцію проводять після мийки обладнання та перед стерилізацією. Після витримки дезінфектанту обладнання ретельно промивають стерильною водою (питною, яка відповідає ДСТУ 7525:2014), поки промивні води не стануть нейтральними (pH 6,0 – 7,5), а потім проводять стерилізацію.

0,5 – 1 % розчин надуксусної кислоти (НУК, $CH_3C(O)OOH$)

Надуксусна кислота – це сильний окисник, який постачається у вигляді стабілізованого водного розчину (зазвичай 15–40 % концентрації). Робочий розчин готують безпосередньо перед використанням шляхом розведення концентрату питною водою (кімнатної температури) у спеціально відведеній ємності з хімічно стійкого матеріалу (поліетилен, скло, нержавіюча сталь).

Для отримання 0,5 % розчину з 38 % комерційного препарату:

Vконц = (0,5 % * Vроб) / 38 % – наприклад, для 10 л робочого розчину: (0,5 * 10000) / 38 ≈ 132 мл концентрату доводять водою до 10 л.

Для 1 % розчину: на 10 л – 263 мл 38 % НУК.

Розчин ретельно перемішують, перевіряють концентрацію (за допомогою тест-смужок або титрування) та використовують протягом 2–4 годин (надуксусна кислота нестабільна, швидко розкладається).

Для дезінфекції комунікацій: розчин подають у систему за допомогою насоса, заповнюють трубопроводи та витримують 30–60 хв (експозиція) за кімнатної температури. Після цього систему промивають стерильною водою до нейтрального pH та негативної реакції на пероксиди (тест-смужки).

Для зовнішніх поверхонь та пробовідбірників: розчин наносять зрошенням або протиранням чистою ганчіркою (одноразовою серветкою), витримують 30 хв, потім змивають стерильною водою.

2–3 % розчин перекису водню (H_2O_2)

Використовують промисловий 30–40 % пергідроль (або 35 % харчовий). Розведення проводять питною водою безпосередньо у ємності з темного скла або хімічно стійкого пластику (перекис розкладається на світлі).

Для 2 % розчину з 30 % пергідролю: змішати 1 частину 30 % H_2O_2 + 14 частин води (наприклад, 200 мл пергідролю на 2,8 л води для 3 л загального об’єму).

ДР.1.3. Підготовка ферментатора

ДР.1.3.1. Огляд, миття та ополіскування апарату

Після завершення попереднього циклу ферментації та перед початком нового ферментер об'ємом 1 м³ піддають:

1. Зовнішньому огляду (перевірка корпусу, кришок, штуцерів, мішалки, барботера, датчиків, ущільнень) на предмет видимих пошкоджень (тріщини, корозія, ослаблення кріплень).

2. Мийці CIP (очищення на місці, без розбирання, або з частковим розбиранням):

•Подача лужного мийного розчину (1 – 3 % NaOH) з попереднім нагріванням до 70 – 80 °C, циркуляція протягом 30 – 60 хв через мішалку та зрошувальні головки (якщо є), зливання.

•Промивання питною водою до pH < 8,5.

•Подача кислотного мийного розчину від ДР1.2.1 (1 % лимонної або оцтової кислоти, або 0,5 – 1 % HNO_3), циркуляція 20 – 30 хв для видалення мінеральних відкладень, зливання.

•Фінальне ополіскування дистильованою або очищеною водою до нейтрального pH (6,0 – 7,5) та до негативної реакції на миючі засоби (піна ≤0,3 одиниці, візуально – прозора вода, відсутність змочування крапель, які не стікають).

Зовнішні поверхні також протирають дезінфектантом. Для дезінфекції комунікацій, наприклад розчин перекису водню (2–3 %) від ДР 1.2.4 подають у систему, витримують 60 хв (при 3 % – 30 хв), потім зливають. Промивання водою не обов’язкове (перекис розкладається на воду і кисень), але для видалення пухирців кисню рекомендується короткочасне продування стерильним повітрям або промивка стерильною водою.

Для зовнішніх поверхонь та пробовідбірників: протирання чи зрошення,

експозиція 30 хв, після чого поверхні витирають насухо стерильною серветкою (залишкова волога може сприяти корозії, хоча сам перекис неагресивний до нержавіючої сталі).

ДР.1.3.2. Перевірка на герметичність ферментера

Після миття, ополіскування, закриття всіх люків, штуцерів та встановлення фільтрів на лініях подачі повітря, середовища та виходу відпрацьованого повітря, ферментер перевіряють на герметичність:

У ферментер подають стерильне стиснене повітря (від ДР 2.7) під надлишковим тиском 0,15 – 0,20 МПа. Ферментер герметизують (перекривають всі засувки на виході) та лінію подачі повітря. Контролюють падіння тиску за манометром протягом 30 хв (при закритому стані, без продування). Допустиме падіння тиску – не більше 0,005 МПа (5 кПа) за 30 хв.

Додатково оброблюють з'єднання мильним розчином для виявлення негерметичного з'єднання. Якщо течі виявлені – їх усувають (підтяжка кріплень, заміна прокладок), після чого перевірку повторюють.

ДР.1.3.3. Стерилізація ферментера

У ферментер після попереднього прогрівання глухою парою подають гостру насичену пару під тиском у внутрішню порожнину ферментера (через штуцери при відкритому вихлопі та закритих вихідних лініях), поступово видаляючи конденсат через нижній штуцер. Після досягнення температури 121 – 131 °С (тиск ~ 0,1-0,2 МПа) витримують 45 – 60 хв (для об'єму 1000 л).

Після завершення витримки припиняють подачу пари, стравлюють тиск через стерильний фільтр на вихлопі, охолоджують до робочої температури (28 – 30 °С) за допомогою сорочки охолодження (або змійовика), подаючи стерильне повітря для підтримки надлишкового тиску (≈0,02-0,05 МПа) для забезпечення стерильності.

Після стерилізації (перед подачею середовища) ферментер готовий до роботи (подають стерильне повітря (ДР 2.7), встановлюють необхідні параметри контролю, перевіряють стерильність шляхом посіву змивів на поживні середовища).

ДР.1.4. Підготовка приміщень

ДР.1.4.1. Щоденне прибирання

Щоденно (перед початком робочої зміни, під час зміни або після її закінчення) проводять вологе прибирання приміщень ферментаційного цеху, лабораторій, побутових кімнат:

•Підлоги, стіни (до рівня 1,5 – 2 м), робочі поверхні, дверні ручки, вимикачі протирають ганчіркою, змоченою у дезінфікуючому розчині (від ДР 1.2.2, 0,5 – 1 % хлорамін Б або 3 % H_2O_2)

•Видаляють пил та видимі забруднення.

•Після дезінфекції проводять провітрювання приміщення (включення припливно-витяжної вентиляції) протягом не менше 20 –30 хв до зникнення запаху хлору або інших агентів:

Обладнання (ферментери, збірники, столи, шафи) протирають зовні дезінфектантом, що не викликає корозії. Використовувати абразивні матеріали заборонено.

•зовнішні поверхні ферментерів, збірників та іншого металевого обладнання – 70 % розчином етанолу (від ДР 1.2.4);

•столи, шафи, неметалеві поверхні – 0,5 – 1 % розчином хлораміну Б або розчином перекису водню (від ДР 1.2.2).

ДР.1.4.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять не рідше одного разу на місяць (або частіше – після аварійних розливів, виявлення контамінації, перед тривалими зупинками обладнання). Додатково – перед плановим ремонтом та після нього.

Перелік робіт під час генерального прибирання:

1. Мийка та дезінфекція підлог, стін, стель, вікон, дверей, комунікацій, вентиляційних ґрат проводиться з використанням мийних засобів (згідно з ДР 1.2.1), а потім – дезінфекція розчинами від ДР 1.2.2 (наприклад, 0,5–1 % хлорамін Б, 0,5–1 % гіпохлорит натрію, 3 – 6 % перекис водню).

2. У разі необхідності проводять вологу дезінфекцію аерозольним способом (розпилення дезінфектанту з витримкою 1 – 2 год при закритому приміщенні) від ДР.1.2.2.

3. Після закінчення експозиції проводять ретельне провітрювання та вологе прибирання чистою водою (для видалення залишків дезінфектанту).

4. Стелажі, меблі, додаткове обладнання (непроцесне) також піддають мийці та дезінфекції зовнішніх поверхонь водночас з приміщенням (розчинами з ДР 1.2.2 або ДР 1.2.4 залежно від матеріалу).

5. Контроль якості прибирання: візуальний (відсутність пилу, плям, брудних патьоків); мікробіологічний (змиви з поверхонь до початку роботи) – за вимогами GMP.

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою повітрозабірника, розташованого на висоті 16 – 18 м від рівня підлоги першого поверху (приблизно 2 – 3 м над дахом будівлі заввишки 13 – 14 м). Це запобігає потраплянню пилу, аерозолів та сторонньої мікрофлори з виробничих приміщень.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних часток

Повітря надходить у головний фільтр грубої очистки, заповнений волокнистим фільтрувальним матеріалом. Ступінь очищення – до 95 %, початковий перепад тиску – не більше 80 Па, кінцевий – до 450 Па. Видаляються великі механічні домішки та значна частина мікробних клітин.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Очищене повітря подається в компресор, де стискається до тиску 0,35 – 0,40 МПа. У процесі стиснення температура повітря підвищується до 120 – 200 °С, що сприяє частковій інактивації мікроорганізмів.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення конденсату

Гаряче стиснене повітря надходить у теплообмінник для охолодження до температури 25 – 30 °С. При цьому відносна вологість знижується приблизно до 60 %, а сконденсована волога видаляється у ресивері-вологовідділювачі.

ДР 2.5. Нагрівання повітря перед очисткою

Осушене повітря нагрівається у теплообміннику до температури 50 °С, що знижує відносну вологість до 50 % та запобігає конденсації води у фільтрах тонкої очистки.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря проходить через головний стерилізуючий фільтр (з мікроволокнистим або мембранним елементом), встановлений у ферментаційному відділенні. Ступінь очищення – до 99,9 %, перепад тиску – від 80 Па до 450 Па. Це забезпечує затримання більшості залишкових мікроорганізмів.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Перед подачею безпосередньо у ферментер, посівний апарат, інокулятор та колби повітря додатково стерилізується в індивідуальних мембранних фільтрах тонкої очистки.

Ступінь очищення – до 99,995 % (практично повна стерильність), початковий перепад тиску – до 140 Па, кінцевий – до 600 Па. Фільтри встановлюються максимально близько до вводу в апарат.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6% - ї соляної кислоти

У збірник об’ємом 1 л за допомогою мірного циліндра або об’ємного дозатора вносять 505 мл води питної (дистильованої), вмикають перемішування і повільно додають 95 мл 38 %-ї HCl. Приготований 6 %-й розчин HCl загальним об'ємом 600 мл не стерилізується. Збірник герметично закривають кришкою. Розчин використовують для підкислення великого об'єму середовища перед стерилізацією.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація розчину гідроксиду натрію

У збірник об’ємом 1 л за допомогою об’ємно-вагового дозатора вносять 36 г кристалічного NaOH і додають 564 мл дистильованої води, вмикають перемішуючий пристрій. У сорочку збірника подають охолоджену воду. Приготований розчин лугу стерилізують гострою парою у збірнику при температурі 121 °С упродовж 40 хв. Отриманий 6 %-й розчин зберігають у стерильному збірнику.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

Для приготування посівного матеріалу на качалочних колбах необхідно приготувати 0,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для середовища наведено в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,4 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,4 л середовища, г	Композиція	Об’єм композиції, мл
Глюкоза	20	8,0	1	250
Дріжджовий екстракт	3	1,2		
$MgSO_4$	0,1	0,04	2	50
K_2HPO_4	2	0,8	3	100
KH_2PO_4	2	0,8		

ДР 4.1.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 8,0 г глюкози та 1,2 г дріжджового екстракту. Наважки вносять у колбу об’ємом 500 мл, додають 250 мл дистильованої води та перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 121 °С упродовж 20 хв. Простерилізовану композицію передають на стадію ДР 4.1.4

ДР 4.1.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах зважують 0,04 г $MgSO_4$, вносять у колбу об'ємом 100 мл та додають 50 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 30 хв. Простерилізовану композицію передають на стадію ДР 4.1.4

ДР 4.1.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

На електронних вагах зважують 0,8 г K_2HPO_4 і 0,8 KH_2PO_4. Наважку поміщують у колбу об'ємом 200 мл та додають 100 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С упродовж 30 хв. Простерилізовану композицію передають на стадію ДР 4.1.4

ДР 4.1.4. Змішування усіх компонентів

Після стерилізації усіх композицій їх охолоджують до температури 40°С і зливають у стерильних умовах у засівну колбу об’ємом 1л. Колбу передають на засів качалочних колб до ТП 5.4.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Згідно з розрахунками у розділі 2.3.3 диплому, для інокулятора об’ємом 10 л необхідно отримати Vкр = 5 л культуральної рідини.

З урахуванням втрат (10 %) робочий об’єм в апараті становить 6 л.

При коефіцієнті заповнення 0,6 об’єм інокулятора – 10 л.

Кількість поживного середовища, яку необхідно приготувати становить 4,6 л. розрахунки необхідної кількості компонентів наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів поживного середовища для інокулятора 10 л

Компонент поживного середовища	Концент-рація, г/л	Вміст компонента у 4,6 л середовища, г	Компо-зиція	Об’єм композиції, л	Параметри стерилізації та об’єм композиції
Глюкоза	20	92,0	1	3	112 °С, 30 хв 3 л
Дріжджовий екстракт	3	13,8			
$MgSO_4$	0,1	0,46	2	0,6	131 °С, 40 хв 0,6 л
K_2HPO_4	2	9,2	3	1	131 °С, 40 хв 1,0 л
KH_2PO_4	2	9,2			

ДР 4.2.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 92 г глюкози та 13,8 г дріжджового екстраку. Наважку поміщають у колбу об’ємом 5 л та за допомогою мірного циліндра вносять 3 л дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 112 °С упродовж 30 хв. Простерилізовану композицію передають на стадію ТП 5.5.

ДР 4.2.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах зважують 0,46 г $MgSO_4$. Наважку поміщають у збірник об’ємом 1 л та додають 0,6 л дистильованої води і перемішують. Розчин стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв, закритому ватно-марлевою пробкою або кришкою з фільтром. Простерилізовану композицію передають на стадію ТП 5.5.

ДР 4.2.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

На електронних вагах зважують 9,2 г K_2HPO_4 та 9,2 г KH_2PO_4. Наважку переносять у колбу об’ємом 2 л, додають 1 л дистильованої води та перемішують до повного розчинення.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв, закритому ватно-марлевою пробкою або кришкою з фільтром. Простерилізовану композицію передають на стадію ТП 5.5.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація середовища для інокулятора об'ємом 100 л

Для вирощування інокуляту необхідно 47 л поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу об'ємом 5 л (10 % від об'єму середовища) загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування поживного середовища, становить 52 л.

Таблиця 4.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 100 л середовища

Компонент поживного середовища	Концен-трація, г/л	Вміст компонента у 47 л середовища, г	Компо-зиція	Об'єм композиції, л	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	940	1	44	112 °С, 30 хв 44 л
Дріжджовий екстракт	3	141			
$MgSO_4$	0,1	4,7	2	3	131 °С, 40 хв 3 л
K_2HPO_4	2	94			
KH_2PO_4	2	94			

ДР 4.3.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 940 г глюкози та 141 г дріжджового екстракту. Наважку вносять у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 100 л, додають 44 л питної (дистильованої) води та перемішують до повного розчинення. Інокулятор закривають кришкою і стерилізують при 112°С упродовж 30 хв. Після чого охолоджують до 40°С.

ДР 4.3.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах зважують 94 г K_2HPO_4, 94 г KH_2PO_4 та 4,7 г $MgSO_4$. Наважки вносять у колбу об'ємом 5 л, додають 3 л питної води. Для кращого розчинення колбу можуть попередньо нагріти на водяній бані.

Після повного розчинення додають 6% розчин HCl (від ДР 3.1) до досягнення pH 4,5 – 5,0 (для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію). Стерилізацію композиції 2 проводять в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Після стерилізації вирівнюють pH середовища за допомогою 6% гідроксиду натрію від ДР 3.2. та передають до стадії ДР 4.3.1 для внесення в інокулятор у стерильних умовах.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 1 м^3

Для культивування *Xanthomonas campestris* B6720 у ферментері об'ємом 1 м^3 необхідно приготувати 518 л поживного середовища.

Таблиця 4.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1 м^3 середовища

Компонент поживного середовища	Концен-трація, г/л	Вміст компонента у 518 л середовища, г	Компо-зиція	Об’єм композиції, л	Об’єм композиції, л
Глюкоза	20	10360	1	400 л	112 °С, 3–5 хв
Дріжджовий екстракт	3	1554			
$MgSO_4$	0,1	51,8	2	118 л	131 °С, 5–7 хв
K_2HPO_4	2	1036			
KH_2PO_4	2	1036			

ДР 4.4.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

У підготовлений стерильний ферментер об’ємом 1м^3 за допомогою об’ємно-вагового дозатора вносять 10360 г глюкози та 1554 г дріжджового екстракту. Додають дистильовану воду до загального об’єму 400 л, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення.

Стерилізують гострою парою при 112 °С упродовж 3 – 5 хвилин (пом’якшений режим для запобігання карамелізації глюкози та збереження термолабільних компонентів екстракту). Композицію 1 передають до ТП 6.1.

ДР 4.4.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

У реакторі-змішувачі (або збірнику) об’ємом 500 – 600 л за допомогою дозатора вносять 1036 г K_2HPO_4, 1036 г KH_2PO_4 та 51,8 г $MgSO_4$. Додають питну воду до загального об’єму 400 л. Для кращого розчинення в сорочку подають пару (до 40 °С) і вмикають перемішування (100 – 150 об/хв) до повного розчинення.

Після розчинення pH доводять до 4,5 – 5,0 за допомогою 6 % розчину HCl (від ДР 3.2). Це запобігає утворенню нерозчинних фосфатів магнію.

Стерилізація: композицію стерилізують гострою парою при 130 – 131 °С упродовж 5 – 7 хвилин. Після стерилізації охолоджують та передають композицію 2 до ТП 6.1.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Xanthomonas campestris* B6720 зберігають у пробірках зі скошеним твердим поживним середовищем (м'ясо-пептонний агар або середовище з глюкозою) при температурі 4 °С. Пересіви культури здійснюються кожні 3 – 4 місяці в асептичних умовах (у ламінарному боксі або над полум'ям пальника).

ТП 5.2. Отримання робочої культури

Музейну культуру *Xanthomonas campestris*, що зберігається в пробірках зі скошеним агаризованим середовищем, пересівають на чашки Петрі для отримання ізольованих колоній і вирощують у термостаті 24 – 48 год при температурі 28 – 30 °С.

ТП 5.3. Отримання робочої культури на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії (жовтого кольору, слизисті, опуклі) за допомогою мікробіологічної петлі переносять у пробірки зі скошеним щільним середовищем (того ж складу) та інкубують у термостаті 24 – 48 год при температурі 28 – 30 °С. Отриману культуру використовують для приготування посівного матеріалу на наступних стадіях.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

В асептичних умовах (у ламінарному боксі або над полум’ям пальника) у 4 стерильні колби об’ємом 750 мл послідовно вносять підготовлене та стерильне поживне середовище по 100 мл (від ДР 4.1.4).

В окрему пробірку з робочою культурою *Xanthomonas campestris* B6720, вирощеною на агаризованому середовищі (від ТП 5.3), вносять 20 мл стерильного фізіологічного розчину (0,9 % NaCl). Клітини суспендують мікробіологічною петлею або піпеткою, отриману бактеріальну суспензію відбирають і переносять у колбу з поживним середовищем з розрахунку 5 мл на колбу.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і вирощують культуру на качалці (200 – 250 об/хв) упродовж 24 год при температурі 28 – 30 °С.

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

Після стерилізації усіх композицій їх охолоджують до температури 40°С і зливають у стерильних умовах у засівну колбу об’ємом 5 л. Колбу передають на засів посівного апарату об’ємом 10 л. В інокулятор об'ємом 10 л асептично подають: композицію 1 (від ДР 4.2.1), композицію 2 (від ДР 4.2.2), композицію 3 (від ДР 4.2.3).

Загальний об’єм поживного середовища в інокуляторі становить 4,6 л (згідно з розрахунками). Перемішування ввімкнути.

За допомогою автоматичної системи регулювання pH доводять значення до 6,8 – 7,2, використовуючи стерильний 6 % розчин NaOH (від ДР 3.2).

Далі через засівну колбу асептично вносять посівний матеріал (від ТП 5.4) у кількості 10 % від об’єму поживного середовища (тобто 0,46 л).

Температура – 28 – 30 °С, перемішування – 200–250 об/хв, аерація – стерильним повітрям згідно з ДР 2. Тривалість – 24 год.

ТП 5.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 100 л

У посівний апарат об'ємом 100 л, який містить стерильну композицію 1 (від ДР 4.3.1) подають стерильну композицію 2 (від ДР 4.3.2).

Композиції перемішують. Отримане поживне середовище має загальний об’єм 47 л. За допомогою стерильного 6 % розчину NaOH, HCl (від ДР 3.1, ДР 3.2) доводять pH до 6,8 – 7,2 (якщо необхідно).

Далі через засівну колбу асептично вносять посівний матеріал з інокулятора (від ТП 5.5) у кількості 10 % від об’єму поживного середовища.

Температура – 28 – 30 °С, pH – 6,8 – 7,2 (підтримується автоматично), перемішування – 200 – 250 об/хв, аерація – стерильне повітря згідно з ДР 2.7, витрата – 0,5 – 1,0 л/хв. Тривалість культивування – 24 год.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Ферментація

У стерильний ферментер об’ємом 1 м³ в якому міститься стерильна композиція 1 (ДР 4.4.1) та вносять стерильну композицію 2 (від ДР 4.4.2).

Композиції перемішують. Отримане поживне середовище має загальний об’єм 518 л. За допомогою стерильного 6 % розчину NaOH (від ДР 3.2) доводять pH до 6,8 – 7,2 (за потреби).

Далі через засівну колбу або трубу перетискування асептично вносять посівний матеріал з посівного апарату об’ємом 100 л (від ТП 5.6) у кількості 10 % від об’єму поживного середовища, тобто ≈52 л.

Температура – 28 – 30 °С, pH – 6,8 – 7,2 (підтримується автоматично за допомогою 6 % NaOH та 6 % HCl від ДР 3.1, ДР 3.2), перемішування – 200 – 250 об/хв, аерація – стерильне повітря згідно з ДР 2.7, витрата розраховується виходячи з об’єму (зазвичай 0,5 – 1,0 л/хв). Ферментація відбувається 72 год до накопичення ксантану 8-8,12 г/л.

ТП 7. Зберігання культуральної рідини

ТП 7.1. Передача культуральної рідини до стадії виділення та очищення

Культуральну рідину (від ТП 6.3) після теплової інактивації (60 – 80 °С, 30 хв) за допомогою насосу подають у збірник об'ємом 1 м³ (1000 л), де відбувається її зберігання при кімнатній температурі (20 – 25 °С) до початку стадій виділення та очищення продукту. Тривалість зберігання не повинна перевищувати 24 год для запобігання розвитку сторонньої мікрофлори та деградації ксантанової камеді.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів

Залишки титрувальних розчинів (від ДР 2.1.1, ДР 2.1.2, ДР 2.1.3, ДР 2.2.1, ДР 2.2.2, ДР 2.2.3) – 6 %-ї HCl та 6 %-го NaOH, залишки від приготування композицій поживного середовища (від ДР 4.4.1 – ДР 4.4.3), залишки поживного середовища після невдалого циклу ферментації (при контамінації), а також промивна вода після санітарної обробки обладнання (від мийки ферментера, посівних апаратів, інокулятора, збірників) направляються на очисні споруди підприємства для нейтралізації (доведення pH до 6,5 – 8,5) та подальшого біологічного очищення.

ЗВ 8.2. Знешкодження твердих відходів

Біомаса *Xanthomonas campestris* B6720, яка залишається після фільтрування культуральної рідини (на стадії виділення ксантанової камеді, після осадження спиртом та фільтрації), направляється на утилізацію. Тверді відходи збирають у герметичні контейнери та передають спеціалізованим підприємствам для подальшого знешкодження (спалювання або захоронення на полігонах промислових відходів).

ЗВ 8.3. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря, яке надходить від: інокулятора (ТП 5.5) – об'ємом 10 л, посівних апаратів (ТП 5.6, ТП 5.7) – об'ємом 100 л, ферментера (ТП 6.1) – об'ємом 1 м^3.

Направляють у системи очищення повітряних відходів (циклони, скрубери, біофільтри або системи каталітичного дожигання) для видалення аерозолів, пилу, мікроорганізмів та органічних сполук перед викидом в атмосферу.

Висновок до розділу 4

У розділі 4 розроблено та детально описано технологічну схему біосинтезу ксантану з використанням штаму *Xanthomonas campestris* B6720, яка включає повний цикл виробництва: санітарну підготовку виробництва (персоналу, приміщень, обладнання), підготовку стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів та поживних середовищ різних об’ємів, багатостадійне нарощування посівного матеріалу (колби, інокулятор 10 л, посівний апарат 100 л), виробничий біосинтез у ферментері об’ємом 1 м³, зберігання культуральної рідини та знешкодження відходів.

Обґрунтовано необхідність роздільної стерилізації композицій поживного середовища для запобігання карамелізації вуглеводів та утворенню нерозчинних фосфатів магнію. Визначено основні параметри культивування (температура 28 – 30 °С, pH 6,8 – 7,2, аерація 0,5 – 1,0 л/хв, перемішування 150–200 об/хв) та режими стерилізації (112 °С для композиції з глюкозою та дріжджовим екстрактом, 131 °С для сольової композиції). Особливу увагу приділено забезпеченню стерильності процесу (стерилізація гострою парою, багатоступенева фільтрація повітря з високою ефективністю очищення) та мінімізації впливу на довкілля (нейтралізація рідких відходів, утилізація біомаси, очищення відпрацьованого повітря).

РОЗДІЛ 5.
КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Метою виробничого контролю якості ксантанової камеді є підтвердження її відповідності нормативним вимогам та забезпечення безпеки для споживачів. Контроль якості на виробництві передбачає перевірку проміжних продуктів (поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини на різних стадіях ферментації) та готового продукту. Методи контролю базуються на рекомендаціях Спільного експертного комітету ФАО/ВООЗ з харчових добавок (JECFA), вимогах Європейської Фармакопеї, Фармакопеї США (USP) та національних стандартах (наприклад, GB 1886.41-2015 для харчової промисловості). Весь контроль якості здійснюється методами, зазначеними в нормативній документації на продукт.

5.1. Визначення споживання джерела вуглецю

Концентрацію глюкози в культуральній рідині визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, використовуючи принцип розділення компонентів суміші на колонці, заповненій сорбентом, на основі їх різної спорідненості до рухомої фази. Зокрема, супернатант, отриманий після центрифугування розведеного бульйону, аналізували на хроматографі при температурі 35 °C. Розділення здійснювали на колонці, а виявлення компонентів - за допомогою детектора показника заломлення. Як рухому фазу використовували розчин сірчаної кислоти (H_2SO_4) з концентрацією 5 ммоль/л, який подавали зі швидкістю потоку 0,6 мл/хв[16].

5.2. Визначення рівня біомаси культури

Для вимірювання біомаси використовують метод спектрофотометрії. Для цього відбирають пробу культуральної рідини об’ємом 5 мл та розчиняють у 45 мл 75 деіонізованої води, після чого центрифугують при 36000 g протягом 30 хвилин, щоб відділити клітини від залишків поживного середовища. Клітини ресуспендують в 40 мл фізіологічного розчину, центрифугують при 36000 г протягом 10 хв, а потім тричі промивають деіонізованою водою. Потім клітини відділяють та суспендують в 5 мл деіонізованої води та вимірюють їх оптичну густину при довжині хвилі 600 нм за допомогою спектрофотометра. Далі за допомогою калібрувального графіка розраховуємо біомасу бактерій[16].

5.3. Визначення чистоти культури

На чашки Петрі з МПА та СА розсівають культуральну рідину шляхом нанесення стерильною піпеткою 0,1 мл культуральної рідини. Далі 5 діб інкубують чашки з МПА за 28-30С, а чашки СА – за 24-26С, після чого розглядають їх на предмет сторонньої мікрофлори.

- м'ясо-пептонний агар (МПА) – для виявлення бактеріальної контамінації;
- сусло-агар (СА) – для виявлення контамінації дріжджами та пліснявами.

При рості на агаризованому середовищі за відсутності контамінації можна спостерігати ріст *Xanthomonas campestris* B6720, які утворюють слизисті колонії діаметром 5-8 мм світло-жовтого кольору з прозорою зоною на краях[16].

5.4. Визначення накопичення ксантану

Для кількісного аналізу ксантану відбирали 5 мл культуральної рідини, додавали до неї 15 мл етанолу, ретельно перемішували та залишали на 24 години для осадження. Після цього полімер осаджували центрифугуванням за частоти обертання 10000 об/хв протягом 20 хвилин. Надосадову рідину видаляли, а отриманий осад висушували за температури 90°С до досягнення постійної маси. Зважування здійснювали на аналітичних вагах. Концентрацію ксантану визначали шляхом перерахунку маси висушеного осаду на один літр вихідної культуральної рідини [16].

Висновок до розділу 5

У цьому розділі описано систему виробничого контролю якості ксантанової камеді, яка синтезується штамом *Xanthomonas campestris* B6720. Показано, що контрольні процедури поширюються як на проміжні технологічні зразки (поживні середовища, посівний матеріал, культуральну рідину на різних етапах ферментації), так і на кінцевий цільовий продукт. Встановлено, що застосовані методики відповідають вимогам міжнародних (JECFA, Європейська Фармакопея, USP) та національних (GB 1886.41-2015) нормативних документів, що гарантує вірогідність результатів і безпечність продукції.

ВИСНОВКИ

У ході написання диплому було здійснено комплексний аналіз біотехнологічного процесу отримання ксантанової камеді за участю бактерії *Xanthomonas campestris* B6720, а також обґрунтовано основні технологічні параметри її промислового виробництва.

Наведено характеристику біологічного агента, включаючи його таксономічний статус, морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості. Встановлено, що штам *Xanthomonas campestris* B6720 є ефективним продуцентом ксантанової камеді, здатним до інтенсивного синтезу екзополісахариду в аеробних умовах та придатним для глибинного культивування у ферментерах.

Проведено техніко-економічне обґрунтування виробництва, у результаті якого визначено потребу у цільовому продукті, розраховано річну потужність виробництва, об’єм культуральної рідини та кількість виробничих циклів. Встановлено, що організація виробництва ксантанової камеді є доцільною, з огляду на її широкий попит у харчовій, фармацевтичній, косметичній та інших галузях промисловості.

Обґрунтовано вибір технологічної схеми виробництва, включаючи підбір поживного середовища, способу проведення біосинтезу та типу ферментаційного обладнання. Визначено оптимальні умови культивування (температура, pH, аерація), що забезпечують максимальний вихід продукту. Особливу увагу приділено вибору ферментера, який повинен забезпечувати ефективний масообмін у середовищах із підвищеною в’язкістю.

Розглянуто вимоги до підготовки аераційного повітря, стерилізації середовища та дотримання асептичних умов, що є критичними для запобігання контамінації та забезпечення стабільності процесу біосинтезу.

Окремо проаналізовано вимоги до мийних та дезінфікуючих засобів, які використовуються у виробництві, та їх відповідність нормативним документам. Визначено основні критерії вибору таких засобів, зокрема ефективність, безпечність та відсутність негативного впливу на обладнання і якість готового продукту.

У результаті виконаної роботи встановлено, що ксантанова камедь є важливим біотехнологічним продуктом із широким спектром застосування. Її виробництво на основі *Xanthomonas campestris* B6720 є технологічно обґрунтованим, економічно доцільним і перспективним напрямком розвитку біотехнологічної галузі в України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Д Р. В. КСАНТАНОВА КАМЕДЬ. Фармацевтична енциклопедія. URL: https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3747/ksantanova-kamed (дата звернення: 26.05.2026).
2. Kopal Kashaudhan, et al. "Production and Applications of Xanthan Gum, A Polymeric Material Obtained from Xanthomonas Campestris: A Mini Review." AIIR Proceedings,Dec2023. https://www.researchgate.net/profile/Kashaudhan/publication/377070285_Production_and_Applications_of_Xanthan_Gum_A_Polymeric_Material_Obtained_from_Xanthomonas_Campestris_A_Mini_Review/links/66f3eca1b753fa724d47bf2e/Production-and-Applications-of-Xanthan-Gum-A-Polymeric-Material-Obtained-from-Xanthomonas-Campestris-A-Mini-Review.pdf
3. SpecialChem. "XANTHAN GUM." Cosmetics & Personal Care Formulation Ingredients. https://www.specialchem.com/cosmetics/inci-ingredients/xanthan-gum?F-regulations=VEGAN&locale=en+https
4. Xanthan Gum Formulation & Manufacturing Expert Guide. FormuNova | Beauty, Personal Care & Cosmetic Manufacturing. URL: https://formunova.com/our-ingredients/xanthan-gum/ (date of access: 26.05.2026).
5. Хімічна сировина та харчові добавки | HimSvit. HimSvit. URL: https://himsvit.com.ua/ (дата звернення: 26.05.2026).
6. How Gums are Used in Personal Care Products – Bell Chem. Bell Chem. URL: https://www.bellchem.com/news/how-gums-are-used-in-personal-care-products (date of access: 27.05.2026).
7. eaNUPh: Головна сторінка. URL: https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/29733/3/Нестерак%20Олександра%2009.02.2023р..pdf (дата звернення: 27.05.2026).

8. ARSHINE LIFESCIENCE CO., LTD. ARSHINE LIFESCIENCE CO., LTD. URL: https://arshinechem.com/product-detail/xanthan-gum (date of access: 27.05.2026).

9. Verdessence Xanthan – БІ-А-ХІМ. Новини. URL: https://biakhim.com.ua/produkty/basf/syre-dlya-kosmetiki/verdessence-xanthan (дата звернення: 27.05.2026).

10. | Національний університет «Львівська політехніка». URL: https://lpnu.ua/sites/default/files/2025/radaphd/31847/disertaciyamaykovich.pdf (дата звернення: 27.05.2026).

11. Ukraine's population has decreased by 20 million since 1991 due to migration and war – Deputy PM. Rubryka. URL: https://rubryka.com/en/2025/02/12/kilkist-naselennya-ukrayiny-z-1991-roku-cherez-migratsiyu-ta-vijnu-skorotylasya-na-20-mln-vitseprem-yer-chernyshov/amp/#search (date of access: 27.05.2026).

12. Ксантанова камедь. Загусник у харчовій та косметичній технології. Статті компанії «Клебріг - Гіпермаркет хімічної продукції». "Клебріг - Гіпермаркет хімічної продукції" - контакти, товари, послуги, ціни. URL: https://klebrig.com.ua/ua/a490803-ksantanova-kamed-zagusnik.html?srsltid=AfmBOorPyN_KDUjeZR56KxF-AfL522cxeSJxdeAkYndRzXf-UAcnc5Mm (дата звернення: 27.05.2026).

13. Про затвердження Тимчасової методики ведення митної статистики зовнішньої торгівлі України. Офіційний вебпортал парламенту України. URL: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0746342-06#Text (дата звернення: 27.05.2026).

14. Xanthan gum Importers in Ukraine [Електронний ресурс] // Seair. – Режим доступу: https://www.seair.co.in/xanthan-gum-ukraine-importers (дата звернення: 28.05.2026).

15. Xanthan Gum & Hsn Code 39139000 Imports In Ukraine [Електронний ресурс] // Volza. – Режим доступу: https://www. volza.com/p/xanthan-gum/import/import-in-ukraine/hsn-code-39139000/ (дата звернення: 28.05.2026).

16. eNUFTIR :: Головна. URL: https://dspace.nuft.edu.ua/server/api/core/bitstreams/d89ed529-44b4-4ef8-bcb5-19eb9e2ca0b4/content (дата звернення: 03.06.2026).

17. ДЕЗАКТІН. МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ (ІНСТРУКЦІЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ) [Електронний ресурс] // Дезинфекція. – 2013. – Режим доступу: https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/dezaktin-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/ (дата звернення: 03.06.2026).

18. Хлорамін Б (Chloramine B) [Електронний ресурс] // КОВАЛЕНТ (COVALENT). – Режим доступу: https://www.covalent.com.ua/shop/chloramine-b/ (дата звернення: 03.06.2026).

19. Kampf G, Kramer A. Epidemiologic Background of Hand Hygiene and Evaluation of the Most Important Agents for Scrubs and Rubs [Електронний ресурс] // Clinical Microbiology Reviews. – 2004. – Vol. 17, No. 4. – P. 863–893. – Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523567/ (дата звернення: 06.06.2026).

20. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care [Електронний ресурс] // World Health Organization. – Geneva, 2009. – Режим доступу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144054/ (дата звернення: 06.06.2026).

21. The Effectiveness of Disinfectant Agents: An Overview [Електронний ресурс] // GMP Compliance. – 2024. – Режим доступу: https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/the-effectiveness-of-disinfectant-agents-an-overview (дата звернення: 06.06.2026).

22. Cutasept F Hand Disinfectant [Електронний ресурс] // Faust. – Режим доступу: https://faust.ch/en/index.php/detail/00000b968e7e7e7e7e7e7e7e7e0002 (дата звернення: 06.06.2026).

23. BODE Chemie GmbH – Ein Unternehmen der HARTMANN GRUPPE [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.bode-chemie.com/de-de (дата звернення: 06.06.2026).

24. The Sterillium® Brand [Електронний ресурс] // BODE Chemie. – Режим доступу: https://www.bode-chemie.com/en/company/the-sterillium-brand (дата звернення: 06.06.2026).

Додаток А


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Viribus unitis
Державний біотехнологічний університет
Рейн-Ваальський університет прикладних наук, Німеччина
Університет аграрних наук, Швеція
Природничий дослідницький центр, Литва
Технологічний університет Лулео, Швеція
Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
КО «Харківський зоопарк»
Миколаївський національний аграрний університет
Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААНУ
АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ, ЕКОЛОГІЇ ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
МАТЕРІАЛИ МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ
16–17 квітня 2026 р.
ХАРКІВ
ДБТУ
2026

МІКРОБНІ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДИ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ГАЛУЗІ

К.Е. Гусейнова[1], В.Ю. Потупа[2], Ю.О. Лагутіна[3], Л.В. Шкотора[4], І.М. Волошина[5]

Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, Україна
[1, 2] магістрантки, [3]студентка, [5]доцент
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна
[4]ст. наук. співроб., канд. біол. наук

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) – це позаклітинні вуглеводні біополімери, що синтезуються різними мікроорганізмами, зокрема бактеріями, грибами, дріжджами та мікроводоростями. Їх продукція часто пов'язана з адаптацією клітин до біотичних і абіотичних стресових факторів та відіграє важливу роль у забезпеченні виживання мікроорганізмів у несприятливих умовах середовища [1]. Зокрема, бактеріальні екзополісахариди синтезуються різними метаболічними шляхами, а потім секретуються або у зв'язаній формі навколо поверхні клітини (капсулярні ЕПС), або у вільній формі в середовище росту клітин (слизові ЕПС). Після вивільнення в навколишнє середовище ЕПС зв'язуються з іншими біомолекулами, такими як білки, ліпіди та похідні уронової кислоти, утворюючи позаклітинний матрикс [2]. Останнім часом серед мікроорганізмів-продуцентів екзополісахаридів особливу увагу наукової та промислової спільнот привертають молочнокислі бактерії (МКБ). Відомо, що понад 40 видів МКБ здатні синтезувати широкий спектр ЕПС. Більшість із них мають статус GRAS (загальновизнані як безпечні) або належать до групи з кваліфікованою презумпцією безпеки (QPS), що свідчить про відсутність ризику для здоров'я людини [3]. Виробництво екзополісахаридів поділяють на два основні типи: гомополісахариди, що складаються з одного типу моносахаридного залишку, та гетерополісахариди, які містять два або більше різних моносахаридів. Серед молочнокислих бактерій відомими продуцентами гомополісахаридів є *Leuconostoc mesenteroides* та *Streptococcus mutans*. Натомість здатність до синтезу гетерополісахаридів характерна для ширшого кола представників МКБ. Зокрема, до таких мікроорганізмів належать *Lactococcus lactis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus thermophilus*, а також представники роду *Lactobacillus*, зокрема *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* та *Lactobacillus kefiranofaciens* [4].

Завдяки різноманітності хімічної структури, різним мікробним джерелам, нетоксичності, а також повністю біорозкладному та біосумісному складу, мікробні екзополісахариди активно використовуються у харчовій промисловості, включаючи виробництво молочних продуктів і напоїв, а також у нехарчових галузях, таких як косметична, текстильна, екологічна, сільськогосподарська, медична та фармацевтична промисловості [1]. Проте, найбільш актуальними властивостями ЕПС, синтезованих молочнокислими бактеріями, є їхній значний потенціал застосування в медичній галузі. Згідно дослідженої літератури, мікробні екзополісахариди проявляють імуномодулюючу, антиоксидантну, пребіотичну та антибіоплівкову активність. Крім того, ЕПС вважають перспективними компонентами для створення систем таргетованої доставки лікарських препаратів, а також як біологічно активні сполуки, що можуть допомагати у зниженні рівня холестерину. Важливо зазначити, що на біологічну активність екзополісахаридів впливає їх тип, молекулярна маса, склад моносахаридів та функціональні групи [5].

Мікробні екзополісахариди не розщеплюються травними ферментами людини, тому вони довше залишаються в шлунково-кишковому тракті, що сприяє колонізації кишечника корисними пробіотичними бактеріями. Крім того, вони можуть зменшувати або пригнічувати утворення біоплівки патогенними бактеріями, тим самим запобігаючи інфекційним захворюванням. Встановлено, що існують різні механізми за допомогою яких ЕПС можуть пригнічувати утворення біоплівки, зокрема вони маскують молекули адгезії в

кишковому слизу, тим самим запобігаючи прикріпленню інших бактерій. З іншого боку, припускають, що біоплівки, які утворюються МКБ, сприяють власній колонізації слизової оболонки хазяїна, тим самим пригнічуючи утворення біоплівок бактеріальними патогенами. Також, екзополісахариди знижують рівень холестерину шляхом посилення секреції жовчних кислот. Крім того, ЕПС здатні модулювати імунну функцію, регулюючи продукцію цитокінів, що сприяє пригніченню інфекцій та профілактиці захворювань, пов'язаних з імунодефіцитом, зокрема запальних захворювань шлунково-кишкового тракту. До того ж, їх розглядають як ефективні природні антиоксиданти для запобігання оксидативному стресу, спричиненому вільними радикалами [1, 5]. Бактеріальні екзополісахариди виконують не лише роль біоактивних агентів, але й можуть виступати потенційними носіями цінних лікарських препаратів, включаючи фактори росту та протипухлинні засоби. Виробництво ЕПС як носіїв ліків є відносно простішим порівняно з біологічними каркасами, завантаженими життєздатними клітинами. ЕПС можна модифікувати для забезпечення контрольованого вивільнення лікарських речовин, подовження їхньої стабільності в організмі та підвищення терапевтичної ефективності. Часто для оцінки здатності ЕПС до вивільнення ліків використовують антибіотики як модельні сполуки [4, 5].

Отже, мікробні екзополісахариди мають значний потенціал у медичній та фармацевтичній практиці завдяки безпечності, біосумісності та багатофункціональним властивостям, що робить їх ефективними біоактивними компонентами, пребіотичними агентами та носіями лікарських препаратів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Nguyen H.-T. et al. Advances in microbial exopolysaccharides: present and future applications / ***Biomolecules***. 2024. Vol.14, no.9. P.1162. URL: https://doi.org/10.3390/biom14091162

2. Rana S., Upadhyay L.S.B. Microbial exopolysaccharides: synthesis pathways, types and their commercial applications. ***International journal of biological macromolecules***. 2020. Vol. 157. P. 577–583. URL: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084

3. Xu Y. et al. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: structures, physiochemical functions and applications in the food industry / ***Food hydrocolloids***. 2019. Vol. 94. P. 475–499. URL: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032

4. Waoo A.A. et al. Microbial exopolysaccharides in the biomedical and pharmaceutical industries / ***Heliyon***. 2023. Vol. 9, no.8. P.e18613. URL: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18613

5. Jurášková D., Ribeiro S.C., Silva C.C.G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. ***Foods***. 2022. Vol.11, no.2. P.156. URL: https://doi.org/10.3390/foods11020156