

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОСТЮК Марини Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus brevis* для одержання тиротрицину
керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, д.т.н., проф.,

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus brevis*, цільовий продукт: тиротрицин, об'єм ферментера 5,0 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика тиротрицину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика продуцента тиротрицину. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез тиротрицину. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення тиротрицину. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва тиротрицину – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема виробництва тиротрицину – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика тиротрицину	01.03.2025- 04.03.2025	
2	Обґрунтування вибору та характеристика продуцента тиротрицину	05.03.2025- 11.03.2025	
3	Техніко-економічне обґрунтування	12.03.2025- 25.03.2025	
4	Біосинтез тиротрицину	26.03.2025- 28.03.2025	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	29.03.2025- 09.04.2025	
6	Специфікація обладнання	10.04.2025- 12.04.2025	
7	Опис технологічної схеми	13.04.2025- 14.05.2025	
8	Основні етапи виділення та очищення тиротрицину	15.05.2025- 18.05.2025	
9	Контроль виробництва	19.05.2025- 23.05.2025	
10	Оформлення пояснювальної записки	24.05.2025- 25.05.2025	
11	Виконання графічної частини проекту	26.05.2025- 28.05.25	

Здобувач

_____ (підпис)

Марина КОСТЮК

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Віктор СТАБНІКОВ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена біотехнологічному процесу культивування *Bacillus brevis* з метою одержання тиротрицину — суміші циклічних і лінійних пептидних антибіотиків, що мають широкий спектр протимікробної дії. Актуальність дослідження обумовлена зростанням резистентності збудників до традиційних антибіотиків та потребою в ефективних препаратів локальної дії для лікування інфекцій верхніх дихальних шляхів і запалень ротової порожнини.

У роботі охарактеризовано біологічні властивості продуцента — *B. brevis*, зокрема морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні ознаки, а також наведено обґрунтування його вибору як основного штаму для біосинтезу тиротрицину (було обрано штаму АТСС 8185, що продукує 594,5 мг/л тиротрицину). Проаналізовано оптимальні умови культивування, способи аерації, контроль параметрів середовища та біомаси, що забезпечують підвищення виходу цільового продукту. Обрано та обґрунтовано тип ферментера, стадії підготовки аераційного повітря, а також методи мікробіологічного контролю й санітарної обробки обладнання.

За техніко-економічним обґрунтуванням запропоновано виробництво вітчизняного препарату на основі тиротрицину з метою лікування ангіни. Оскільки в Україні відсутнє відповідне виробництво, було запропоновано забезпечувати половину від річної потреби тиротрицину.

Робота складається зі вступу, 9 розділів та списку використаної літератури, що складається з 41 найменування. Графічну частину роботи представлено у вигляді технологічної та апаратурної схем формату А1 в кількості 1 лист кожного.

Ключові слова: *Bacillus brevis*, тиротрицин, культивування, антибіотики, ферментер, біосинтез, ангіна, пептидні препарати.

ABSTRACT

This qualification thesis is devoted to the biotechnological process of *Bacillus brevis* cultivation for the production of tyrothricin — a mixture of cyclic and linear peptide antibiotics with a broad spectrum of antimicrobial activity. The relevance of the study is determined by the increasing resistance of pathogens to conventional antibiotics and the need for effective topical preparations to treat upper respiratory tract infections and oral inflammations.

The thesis characterizes the biological properties of the producer strain — *B. brevis*, including its morphological, cultural, physiological, and biochemical characteristics. The choice of *B. brevis* ATCC 8185, which produces 594.5 mg/L of tyrothricin, is justified as the primary strain for tyrothricin biosynthesis. The work analyzes the optimal cultivation conditions, aeration methods, and control of environmental and biomass parameters that ensure enhanced yield of the target product. The type of fermenter was selected and justified, as well as the stages of aeration air preparation and methods for microbiological control and sanitary treatment of the equipment.

Based on a techno-economic analysis, the development of a domestic preparation based on tyrothricin for the treatment of tonsillitis is proposed. As no relevant production currently exists in Ukraine, the study suggests establishing facilities capable of covering half of the country's annual demand for tyrothricin.

The thesis consists of an introduction, 9 chapters, and a list of 41 references. The graphical part includes technological and equipment diagrams presented on A1-sized sheets (one of each).

Keywords: *Bacillus brevis*, tyrothricin, cultivation, antibiotics, fermenter, biosynthesis, tonsillitis, peptide preparations.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика тиротрицину.....	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика продуцента тиротрицину.....	14
2.1. Обґрунтування вибору продуцента тиротрицину та поживного середовища для його культивування.....	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Bacillus brevis</i>	20
2.4. Таксономічний статус <i>Bacillus brevis</i>	22
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	24
3.1. Потреба у тиротрицині.....	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів...30	
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	31
РОЗДІЛ 4. Біосинтез тиротрицину.....	34
4.1. Шляхи катаболізму дріжджового екстракту у <i>Bacillus brevis</i>	34
4.2. Біотрансформація дріжджового екстракту в тиротрицин.....	36
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	39
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	39
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	41
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	42
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	42
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів.....	44
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища...48	
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	51
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....	54
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення тиротрицину.....	60
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.....	64

9.1. Мікробіологічний контроль.....	64
9.2. Показники росту і синтезу тиротрицину.....	65
9.2.1. Концентрація біомаси.....	65
9.2.2. Концентрація тиротрицину.....	65
9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	66
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	67

ВСТУП

У XXI столітті людство продовжує зіштовхуватися з численними викликами в медицині та охороні здоров'я, серед яких особливе місце займає проблема антибіотикорезистентності. Зростання кількості мультирезистентних бактеріальних штамів спричинило необхідність пошуку нових ефективних антимікробних засобів або удосконалення існуючих методів виробництва природних антибіотиків. У цьому контексті зростає інтерес до мікроорганізмів – продуцентів біологічно активних речовин, зокрема представників роду *Bacillus*, які синтезують широкий спектр антимікробних пептидів (Salam et al, 2023).

Гострі інфекційні захворювання ротоглотки, зокрема ангіна (гострий тонзиліт), є одними з найпоширеніших причин звернення пацієнтів до лікаря. За даними ВООЗ, щороку у світі реєструють мільйони випадків ангіни, яка може призводити до серйозних ускладнень, включаючи ревматизм, гломерулонефрит, паратонзиллярні абсцеси тощо. Етіологічними агентами захворювання найчастіше є β -гемолітичні стрептококи групи А, стафілококи, пневмококи та інші умовно-патогенні мікроорганізми, які швидко розвивають стійкість до традиційних антибіотиків. У зв'язку з цим виникає нагальна потреба у використанні ефективних антимікробних препаратів місцевої дії, які б діяли безпосередньо в осередку інфекції, мали мінімальні системні побічні ефекти та низький ризик формування резистентності (Anderson, & Paterek, 2023).

Одним із перспективних препаратів у цій галузі є тиротрицин – комплекс природних антибіотиків, що включає граміцидин і тиротрицин-подібні декпептиди, синтезовані *Bacillus brevis*. Ця сполука проявляє швидку та потужну бактерицидну дію проти грампозитивних бактерій, зокрема *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* та *Corynebacterium diphtheriae*, що є типовими збудниками ангіни. Тиротрицин ефективно руйнує клітинні мембрани мікроорганізмів, не лише пригнічуючи їх ріст, а й забезпечуючи прямий лізис

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>	Лит.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Костюк М.С.						
Перевір.		Стабніков В.П.					7	71
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

клітини. Його локальне застосування у вигляді пастилок, спреїв чи мазей дає змогу швидко зменшити симптоми, не чинячи системної дії на організм (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

На сьогодні фармацевтична промисловість пропонує низку комбінованих препаратів для лікування ангіни, які містять тиротрицин у поєднанні з антисептиками або місцевими анестетиками. Проте зважаючи на зростання попиту на природні та ефективні антибіотики місцевої дії, постає завдання підвищення ефективності біотехнологічного процесу їх одержання. Насамперед це стосується оптимізації умов культивування *Bacillus brevis* для збільшення виходу тиротрицину, зменшення собівартості продукції та розширення можливостей її застосування (Razavi, & Fazly Bazzaz, 2019).

На сьогоднішній день тиротрицин входить до складу деяких лікарських засобів місцевої дії, зокрема антисептичних таблеток для горла та мазей для зовнішнього застосування. Однак промислове виробництво цього антибіотика потребує детального вивчення умов культивування продуцента, оптимізації складу поживного середовища, фізико-хімічних параметрів процесу (рН, температури, аерації) та підбору ефективних методів очищення й стандартизації готового продукту. Саме ці аспекти залишаються актуальними в сучасних дослідженнях у галузі біотехнології вторинного метаболізму мікроорганізмів (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

Bacillus brevis є типовим представником родини *Bacillaceae*, здатним до синтезу ряду пептидних антибіотиків у процесі вторинного метаболізму. Завдяки своїм фізіолого-біохімічним особливостям (здатність до споруляції, висока продуктивність, стійкість до несприятливих умов середовища), цей мікроорганізм широко досліджується як у фундаментальних, так і прикладних наукових роботах. Проте технологія отримання тиротрицину вимагає точного підбору як штаму-продуцента, так і режимів його культивування, що обумовлює необхідність глибокого вивчення біосинтетичних шляхів та факторів, що їх регулюють (Özcengiz, & Ögülür, 2015).

Дослідження процесу культивування *Bacillus brevis* для одержання тиротрицину має на меті вдосконалення біотехнологічних підходів до отримання біоактивних сполук. У фокусі такої роботи – не лише оптимізація продуктивності штаму, а й оцінка впливу різних джерел вуглецю, азоту та мікроелементів, а також параметрів ферментації, що в кінцевому підсумку сприятиме підвищенню рентабельності виробництва. Важливим напрямом також є пошук доступної сировинної бази, зокрема можливість використання агропромислових відходів як компонентів живильного середовища (Rodríguez et al, 2021).

Актуальність теми кваліфікаційної роботи полягає в поєднанні трьох ключових факторів: зростання захворюваності на ангіну та поширення резистентних збудників; необхідність застосування природних антибіотиків місцевої дії з доведеною ефективністю; потреба в оптимізації біотехнологічного процесу культивування *Bacillus brevis* для отримання високоякісного тиротрицину з подальшим фармацевтичним застосуванням.

Новизною теми кваліфікаційної роботи є використання високопродуктивного штаму *Bacillus brevis* ATCC 8185, що синтезує 594,5 мг/л тиротрицину та використовує доволі дешеве поживне середовище для цього (Zhang et al, 2012).

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ТИРОТРИЦИНУ

Тиротрицин є природним антибактеріальним агентом, що належить до групи пептидних антибіотиків. Його виробником у природних умовах є грампозитивна спороутворювальна бактерія *Bacillus brevis*. Тиротрицин є сумішшю двох основних фракцій — грамицидинів (лінійних пептидів) і тироцидинів (циклічних пептидів), які разом забезпечують високу бактерицидну активність переважно щодо грампозитивної мікрофлори (Lang, & Staiger, 2016).

Тиротрицин демонструє високу активність переважно проти грампозитивних бактерій, включно зі *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* та *Clostridium* spp. Його механізм дії полягає в порушенні цілісності клітинної мембрани мікроорганізмів шляхом утворення іонних каналів, що призводить до втрати іонного градієнту, витоку клітинного вмісту та загибелі клітини. Такий механізм робить розвиток резистентності до тиротрицину рідкісним явищем, що є важливою перевагою перед багатьма синтетичними антибіотиками (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

Грамицидин є лінійним пептидом, що складається з 15 амінокислотних залишків, із яких значну частину становлять гідрофобні амінокислоти. Він здатен інтегруватися в ліпідний бішар мембрани й формувати димери, які утворюють каналоподібні структури, через які проходять катіони. На відміну від нього, тироцидини — це циклічні декапептиди з вираженою амфифільною структурою, яка забезпечує їх здатність руйнувати мембрану шляхом флуктуації ліпідного бішару (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

Тиротрицин являє собою аморфний порошок світло-жовтого кольору або світло-коричневий гігроскопічний порошок, який має характерний запах. Його не можна охарактеризувати як єдину хімічну сполуку, оскільки він складається з гетерогенної суміші пептидів. Водорозчинність тиротрицину обмежена — він

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Костюк М.С.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТИРОТРИЦИНУ					
Перевір.		Стабніков В.П.						Лім.	Арк.	Аркушів
Реценз.									10	71
Н. Контр.								<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.		Стабніков В.П.								

добре розчиняється в метанолі, етанолі, хлороформі та інших органічних розчинниках, проте майже не розчиняється у воді (PubChem, n.d.).

Основні фізико-хімічні параметри тиротрицину (PubChem, n.d.):

- Зовнішній вигляд - жовтуватий або світло-коричневий порошок
- Молекулярна маса компонентів - тироцидин — близько 1300–1500 Да; грамицидин — ~1880 Да
- Температура плавлення - $>180^{\circ}\text{C}$ (з розкладанням)
- Розчинність:
 - у воді - слабка
 - у етанолі, метанолі - добра
 - у диметилсульфоксиді (DMSO) - добра
- Стабільність - стійкий до помірного нагрівання та до деяких протеаз, але чутливий до тривалого ультрафіолетового опромінення та високих температур

Через високу токсичність при системному введенні тиротрицин використовується винятково місцево, найчастіше у комбінації з іншими антисептичними чи протимікробними засобами. Він входить до складу препаратів, що застосовуються в отоларингології, стоматології, дерматології (PubChem, n.d.).

Найпоширеніші лікарські форми тиротрицину (Lang, & Staiger, 2016):

- таблетки або пастилки для розсмоктування (часто у поєднанні з лідокаїном, бензалконію хлоридом, хлоргексидином);
- спреї для ротової порожнини;
- мазі для місцевого застосування на шкіру;
- гелі для ясен.

З біосинтетичної точки зору тиротрицин утворюється в процесі непослідовного ферментативного складання амінокислот за участю нерибосомальних пептидсинтетаз (NRPS), що кодуються відповідними генетичними кластерами в *Bacillus brevis*. Ці ферментативні комплекси функціонують подібно до конвеєрної системи, активуючи амінокислоти,

з'єднуючи їх у ланцюги та циклізуючи за потреби. Складність цього біосинтетичного процесу обумовлює специфічність умов культивування, необхідних для максимального синтезу тиротрицину, зокрема — вмісту джерел вуглецю й азоту, рН, температури, аерації та складу поживного середовища (Özcengiz, & Ögülür, 2015).

Інтерес до тиротрицину зростає в умовах постійного збільшення кількості випадків бактеріальної резистентності до традиційних антибіотиків. Завдяки природному походженню, широкому спектру активності проти грампозитивної флори, стабільності та відносній доступності мікробіологічного синтезу, тиротрицин має перспективи для розширення застосування та створення нових лікарських форм на його основі (Salam et al, 2023).

В табл.1.1. показані препарати на основі тиротрицину, які доступні на вітчизняному ринку станом на 2025 рік.

Таблиця 1.1.

Виробники тиротрицину, що представлені на українському ринку лікарських засобів

Назва препарату	Форма випуску	Склад (активні речовини)	Виробник	Країна
Трахісан®	Таблетки для розсмоктування	Тиротрицин, хлоргексидин, лідокаїн	Engelhard Arzneimittel GmbH & Co. KG	Німеччина
Ангіноваг спрей	Спрей для ротової порожнини	Тиротрицин, деквалінію хлорид, еноксолон, гідрокортизону ацетат, лідокаїн гідрохлорид	Ferrer Internacional S.A.	Іспанія
Тирозур® гель	Гель місцевого застосування	Тиротрицин (0,1%), цетилпіридинію хлорид	Engelhard Arzneimittel GmbH & Co. KG	Німеччина
Тирозур® порошок	Порошок для зовнішнього застосування	Тиротрицин (1 мг/г)	Engelhard Arzneimittel GmbH & Co. KG	Німеччина

Примітка: таблицю сформовано автором самостійно з джерела (<https://tabletki.ua/substance/4003/>)

Тож, враховуючи дані з табл.1.1. робимо висновок про відсутність українських препаратів, що говорить про потребу створення вітчизняного біотехнологічного виробництва тиротрицину.



Рис.1.1. Лікарські засоби, що містять тиротрицин
(<https://tabletki.ua/substance/4003/>)

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТА ТИРОТРИЦИНУ

2.1. Обґрунтування вибору продуцента тиротрицину та поживного середовища для його культивування

Тиротрицин є сумішшю циклічних та лінійних пептидів з антибактеріальною активністю, яка проявляється головним чином щодо грампозитивних бактерій. Основними компонентами є грамїцидин та тиротрицин. Його продукція пов'язана виключно з життєдіяльністю певних штамів бактерій роду *Bacillus*, серед яких найбільший інтерес становить вид *B. brevis* (сучасна класифікація — *Brevibacillus brevis*) (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

B. brevis — грампозитивна, спороутворююча, аеробна бактерія, яка природно продукує тиротрицин у процесі вторинного метаболізму. Вибір цього мікроорганізму як продуцента зумовлений рядом переваг (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014):

- *B. brevis* є класичним джерелом тиротрицину, вперше описаним ще у 1939 році Дубосом та Хоткінсом.
- При оптимізованих умовах культивування штами *B. brevis* можуть синтезувати значні кількості активного антибіотика.
- На відміну від деяких інших продуцентів антибіотиків, *B. brevis* має високий рівень стабільності синтетичних властивостей при зберіганні та субкультивуванні.
- *B. brevis* не є патогеном для людини, що спрощує роботу з ним у лабораторних і промислових умовах.
- Механізми біосинтезу тиротрицину описані на генетичному та

					НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костюк М.С.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТА ТИРОТРИЦИНУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					14	71
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ферментативному рівнях, що відкриває можливість генної інженерії для підвищення продуктивності.

Окрім *B. brevis*, тиротрициноподібні пептиди здатні продукувати й інші представники роду *Bacillus*, зокрема *Bacillus aneurinolyticus* та деякі штами *Bacillus subtilis*. Проте ці мікроорганізми не забезпечують стабільного та високого виходу саме класичного комплексу тиротрицину, що робить їх менш придатними для цілеспрямованого біосинтезу (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

Тож, в табл.2.1. показана характеристика різних продуцентів тиротрицину.

Таблиця 2.1.

Характеристика продуцентів тиротрицину

Продуцент	Склад поживного середовища в г/л	Кількість тиротрицину, мг/л	Умови культивування	Література
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185	Казеїновий пептон – 10,28, Дріжджовий екстракт – 11,03, NaCl – 4,62	594,50	37 °C, 6 днів, 180 об/хв, Початкове рН – 7,0	Zhang, Jiang, Ren, Yang, & Guo, 2012
	Триптон – 10, Глюкоза – 10, Дріжджовий екстракт – 5, KH ₂ PO ₄ – 0,5, K ₂ HPO ₄ – 0,5, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5, NaCl – 0,01, MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,01, FeSO ₄ ·4H ₂ O – 0,01, CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,022	228,5	37 °C, 4 дні, Статичні умови, Початкове рН – 7,0	Okuda, Edwards, & Winnick, 1963
<i>Bacillus brevis</i> TC	Середовище целтон (склад даного середовища є комерційною таємницею компанії Cambridge Isotope Laboratories)	380	37 °C, 7 днів	Vogt, Schinzel, & Bechinger, 2003

Закінчення табл.2.1.

<i>Bacillus brevis</i> ATCC 10068	K ₂ HPO ₄ – 0,5 KH ₂ PO ₄ – 0,5 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2 NaCl – 0,01 MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,01 FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01 CaH ₄ (PO ₄) ₂ ·H ₂ O – 2, L-аспарагін – 2,5 Гліцерин – 4	50	37 °С, 36 год	Seddon, & Fynn, 1973
--------------------------------------	---	----	------------------	-------------------------

Тож, з табл.2.1. видно, що найвища концентрація комплексного антибіотику притаманна для штаму *B. brevis* ATCC 8185, що синтезує близько 0,6 г/л цільового продукту (стаття 2012 року). На жаль, найбільша кількість робіт, присвячена тиротрицину залишилась у ХХ столітті, тому в таблиці наведені для порівняння статті 1973 та 1963 року, хоча більша кількість досліджень притаманна проміжку в 1940-1950 року. Але, зважаючи на вік тих робіт, було запропоновано розглянути більш новіші статті.

Для подальшого порівняння недоцільно використовувати штам *Bacillus brevis* ТС, оскільки середовище, яке використовується для його культивування, є комерційною таємницею виробника (тобто, скласти його самостійно для здешевлення – неможливо), а також має чималу вартість – 314 \$ за 0,1 л (Celstone Complete Medium (13C, 98%; 15N, 98%) - Cambridge Isotope Laboratories, CGM-1040-CN-0.1, n.d.).

В табл.2.2. розраховано вартість поживних середовищ для продуцентів тиротрицину, що пропонується використовувати для подальшого порівняння.

Таблиця 1.2.

Визначення вартості поживного середовища для одержання ферменту лаккази

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації*
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185	Казеїновий пептон – 10,28	1530	15,73	1
	Дріжджовий екстракт – 11,03	703	7,75	2
	NaCl – 4,62	3	0,01	3
	Вартість 1 л середовища ≈ 23,49 грн			

Закінчення табл.2.2.

<i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185	Триптон – 10	1530	15,3	1
	Глюкоза – 10	55	0,55	4
	Дріжджовий екстракт – 5	703	3,52	2
	NaCl – 0,01	3	0,00003	3
	KH ₂ PO ₄ – 0,5	200	0,1	5
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	187	0,09	6
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5	45	0,02	7
	MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,01	238	0,002	8
	FeSO ₄ ·4H ₂ O – 0,01	25	0,0003	9
	CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,022	26	0,0006	10
Вартість 1 л середовища ≈ 19,58 грн				

<i>Bacillus brevis</i> ATCC 10068	Гліцерин – 4	76	0,31	11
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	187	0,09	6
	KH ₂ PO ₄ – 0,5	200	0,1	5
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2	45	0,01	7
	NaCl – 0,01	3	0,00003	3
	MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,01	238	0,002	8
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01	25	0,0003	9
	CaH ₄ (PO ₄) ₂ ·H ₂ O – 2,	680	1,36	12
	L-аспарагін – 2,5	690	1,73	13
	Вартість 1 л середовища ≈ 3,60 грн			

Примітка: 1 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-pepton-osnovnyj?srsId=AfmBOoqFCqW76mOZ4iYc0gkzy-C4-L-p1nAuN0OsQoChBv1rDowtFx5E>, 2 - <https://vianoksgel.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt.html>, 3 - <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/artemsol-sol-pischevaya-i-tehnicheskaya-sl-harchova-ta-tehnchna-opt-pdv-IDOSShh.html>, 4 - <https://prom.ua/p1305199349-glyukoza-kristalicheskaya-dekstroza.html>, 5 - <https://silur.com.ua/ua/p5226694-kalij-fosfornokislyj-zam.html>, 6 - https://harkiv-torg.com.ua/ua/p825624658-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?srsId=AfmBOoo1tCbuns5EAti5rL133pWlpAkUn2X-G5htVGZO6mEc JSq_HP, 7 - <https://mychem.in.ua/ua/p2088566151-magnij-sulfat-vodnyj.html?srsId=AfmBOooazx--PXGuVu8uTBktua9xzVwghZNLsBYRDRIHs4pgojSIuCE2>, 8 - <https://prom.ua/p277934134-marganets-hloristyj-vodnyj.html>, 9 - <https://alhim.com.ua/uk/produksiia/agrokhimiya/zaliznij-kuporos>, 10 - <https://alhim.com.ua/uk/produksiia/protiozheledni-reagenty/kaltsij-khloristij>, 11 - <https://sata-group.com.ua/ua/p2065051586-glitserin-farmakopejnyj-pischevoj.html?srsId=AfmBOoouBWpwQfw8zzqNcHbSRYyCkyNSOE9Hx2y-36G1RLVPZpV06JC>, 12 - https://www.alibaba.com/product-detail/Worth-Buying-Calcium-Phosphate-Dibasic-Powder_1601284677555.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.3dff13a0dgpMt, 13 - <https://soda.kiev.ua/asparagyn.html>

Тож, з табл.2.2. робимо висновок, що найдешевше середовище притаманне для *B. brevis* ATCC 10068, який синтезує всього 50 мг/л антибіотику. Найдорожче – для *B. brevis* ATCC 8185, що синтезує близько 0,6 г/л тиротрицину. Узагальнені дані представлено в табл.2.3.

Визначення умовної вартості та швидкості утворення тиротрицину

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація тиротрицину, мг/л	Умовна вартість 1 мг тиротрицину, грн/мг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного тиротрицину за годину, мг/год
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185	23,49	594,5	0,039	144	4,13
	19,58	228,5	0,086	96	2,38
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 10068	3,6	50	0,072	36	1,39

Тож, спираючись на розрахунки з табл.2.3. логічним є вибір штаму *B. brevis* ATCC 8185, що синтезує близько 594,5 мг/л тиротрицину, оскільки саме цей штам синтезує найдешевший за умовною вартістю антибіотик, а також кількість мг утвореного тиротрицину за 1 годину є найвищою.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Для розуміння, чи достатньо кількість вуглецю та азоту в середовищі для синтезу тиротрицину пропонується виконати перевірочний розрахунок. Це буде доволі важко зробити, оскільки середовище є напівсинтетичним та містить пептон та дріжджовий екстракт як джерела необхідних елементів.

Хімічна формула тиротрицину - $C_{65}H_{85}N_{11}O_{13}$, а її молекулярна маса – 1228,44 г/моль. На це будемо робити основний опір в наших розрахунках. Варто зазначити, що в роботі не наведено й концентрацію біомаси, що є важливим показником, який ми маємо теоретично розрахувати.

Згідно статті Moreira et al. (2020), вміст карбону в соєвому пептоні становить 44,4%. Оскільки актуальних даних по казеїновому пептону знайти не вдалося, припустимо, що вміст карбону в ньому становить близько 40%. Тож, в середовищі міститься 10,28 г/л пептону, з них $10,28 \cdot 0,4 = 4,112$ г/л припадає на карбон. Далі, визначимо вміст карбону в дріжджовому екстракті. Згідно обговоренню на форумі науковців ResearchGate (https://www.researchgate.net/post/What_is_the_composition_of_yeast_extract), усереднена кількість карбону в дріжджовому екстракті також становить 40%.

Тоді, кількість карбону з дріжджового екстракту становитиме $11,03 \cdot 0,4 = 4,412$ г. Загальна кількість карбону на 1 л середовища становить $4,112 + 4,412 = 8,524$ г. Варто зазначити, що половина з цього піде на холосте окислення, тож, кількість карбону яка піде на біосинтез становить $8,524 / 2 = 4,262$ г.

В 1228 мг тиротрицину міститься $65 \cdot 12 = 780$ мг карбону. Отже, для одержання 594,5 мг тиротрицину необхідно $594,5 \cdot 780 / 1228 = 377,6$ мг $\approx 0,4$ г карбону. З врахуванням, що кількість доступного карбону становить 4,26 г, середовище повністю забезпечує зазначений рівень антибіотику. Знаючи це, можемо розрахувати теоретичний рівень біомаси. В біомасі міститься 50% усього карбону. Тож, теоретична концентрація становить $(4,26 - 0,4) / 0,5 = 7,72$ г/л.

Також, тиротрицин містить азот, який є важливим елементом живлення. Тому, розрахуємо чи вистачає і азоту в вказаному середовищі. Пептон містить в собі 11-14% азоту (усереднено візьмемо 12,5%) (Peptone From Meat Granulated Media 91079-38-8, n.d.). Щодо дріжджового екстракту цей показник становить 8-10% (усереднено – 9%) (Biolab Diagnostics Laboratory Inc., n.d.). З пептону можна одержати $10,28 \cdot 0,125 = 1,285$ г азоту, в той час як з дріжджового екстракт – $11,03 \cdot 0,09 = 0,993$ г. Загальний вміст азоту – $1,285 + 0,993 = 2,278$ г.

В 1228 мг тиротрицину міститься $11 \cdot 14 = 154$ мг азоту. Отже, для одержання 594,5 мг тиротрицину необхідно $594,5 \cdot 154 / 1228 = 74,55$ мг $\approx 0,08$ г. Середовище повністю забезпечує зазначену концентрацію антибіотику. Також, з врахуванням того, що до біомаси входить 10% від азоту навіть без розрахунку зрозуміло, що карбон буде лімітувальним фактором росту обраного біологічного агента.

Також, зазначимо, що для підготовки інокуляту передбачається інше середовище, а так як нам потрібно контролювати рівень біомаси, пропонується зробити теоретичний розрахунок і цього показнику.

Для накопичення інокуляту використовується середовище наступного складу (г/л):

Пептон – 10,

Яловичий бульйон – 5,

NaCl – 5.

Зазначимо, що яловичий бульйон існує в сухій формі, тому додатково готувати його не потрібно (Bolivar Torg, 2025). Вміст азоту в бульйоні буде варіюватись, проте в роботі Chimegee & Dashmaa (2018) вказано, що бульйон містить близько 4% азоту. Щодо карбону – цей показник становить близько 1% (Nutrition Facts for Soup, Beef Broth, Bouillon, Consomme, Prepared With Equal Volume Water, Recommended Daily Values and Analysis., n.d.). Тож, загальний вміст карбону з пептону та яловичого бульйону становитиме: $10 \cdot 0,4 = 4$; $5 \cdot 0,01 = 0,05$; $4 + 0,05 = 4,05$, з них 50% піде на холосте окислення, отже доступного карбону становитиме – $4/2 = 2$ г. Кількість біомаси на 1 л такого середовища становитиме $2 \cdot 2 = 4$ г.

По азоту, його загальний вміст становитиме: $10 \cdot 0,125 = 1,25$; $5 \cdot 0,04 = 0,2$; $1,25 + 0,2 = 1,45$ г азоту. Теоретичний вихід біомаси за азоток – $1,45/0,1 = 14,5$. Тож, карбон буде лімітувальним фактором, а концентрація біомаси під час стадій накопичення становитиме 4 г/л.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Bacillus brevis*

B. brevis (сучасна класифікація — *Brevibacillus brevis*) — грампозитивна, рухома, спороутворююча паличкоподібна бактерія з типово аеробним метаболізмом. Клітини зазвичай прямі або злегка зігнуті, розміром $0,8\text{--}1,2 \times 2,0\text{--}5,0$ мкм, з добре помітними термінальними або субтермінальними спорами, що не деформують клітину. Спори мають овальну форму й дозволяють мікроорганізму зберігати життєздатність у несприятливих умовах довкілля (Logan, & Vos, 2015).



Рис.2.1. Клітини *B. brevis* пофарбовані за Грамом (Public Domain Picture | Bacillus Brevis. Gram Stain., n.d.)

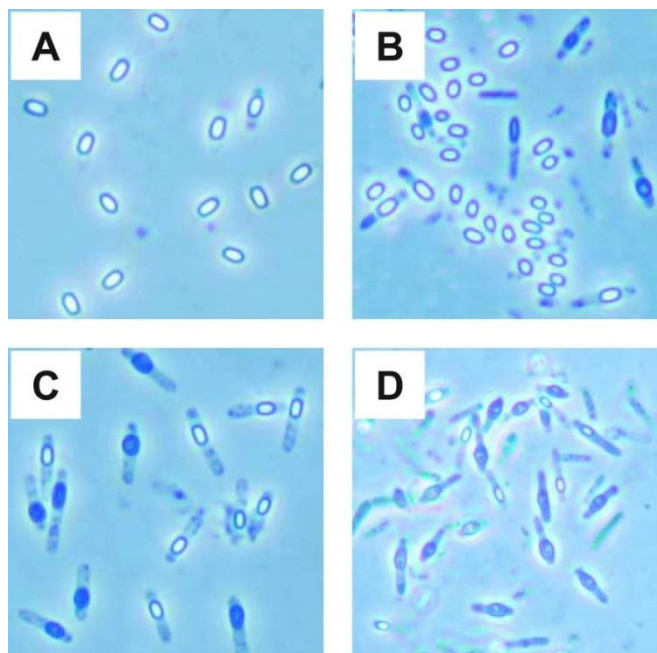


Рис.2.2. Типові спори різних фенотипових штамів *B. brevis* (Berditsch et al, 2007)

На щільних поживних середовищах колонії *B. brevis* мають круглу форму, чіткі краї, сірувато-біле або жовтувате забарвлення, суху або матову поверхню. При тривалому інкубуванні на середовищах, що стимулюють спороутворення, спостерігається формування зморшкуватих або гофрованих колоній. У рідких середовищах бактерія росте рівномірно, утворюючи легкий осад (Berditsch et al, 2007).

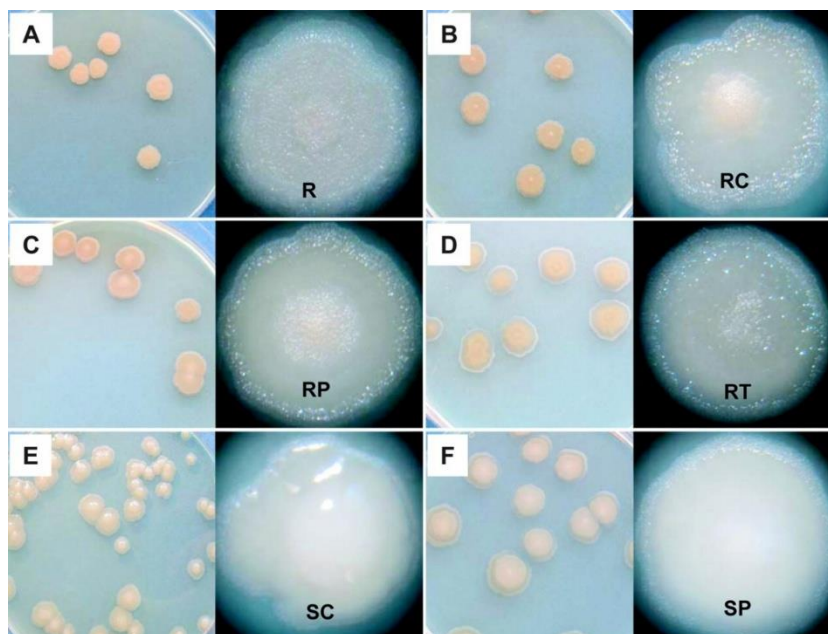


Рис.2.3. Колонії різних за фенотипом штамів *B. brevis* (Berditsch et al, 2007)

B. brevis є облігатно аеробним організмом, здатним до активного дихального метаболізму з утворенням значної кількості вторинних метаболітів, зокрема тиротрицину. Для нього характерна позитивна реакція на каталазу та оксидазу, а також здатність гідролізувати желатину, крохмаль та казеїн. Штам добре асимілює глюкозу, мальтозу, арабінозу та деякі інші вуглеводи з утворенням кислоти без газу. Нітрати відновлюються до нітритів, а індол не утворюється. Оптимальна температура для росту становить 30–37 °С, проте деякі штами можуть рости і при 45 °С (Logan, & Vos, 2015).

2.4. Таксономічний статус *Bacillus brevis*

Bacillus brevis був вперше описаний у 1911 році, а згодом ідентифікований як продуцент тиротрицину в 1939 році Рене Дюбошем. Згідно з сучасною систематикою, заснованою на філогенетичному аналізі 16S рРНК, даний вид був перекласифікований і наразі належить до окремого роду *Brevibacillus*, який відокремлений від поліфілетичної групи *Bacillus sensu lato*. У зв'язку з цим актуальна назва виду — *Brevibacillus brevis* (Nakamura and Jackson, 1995), хоча у більшості наукової та фармакопейної літератури продовжують використовувати історичну назву *Bacillus brevis* через її сталість у контексті продукування тиротрицину.

Таксономічне положення *Brevibacillus brevis* згідно з базою даних NCBI

(Тахоному, n.d.):

Домени: *Bacteria*

Тип: *Bacillota* (раніше *Firmicutes*)

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Paenibacillaceae*

Рід: *Brevibacillus*

Вид: *Brevibacillus brevis* (Migula 1900) Shida et al. 1996

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у тиротрицині

Тиротрицин — це комплексний антибактеріальний препарат, що складається переважно з грамїцидину і тіротрицину (суміші тироцидину та грамїцидину S), отриманий із *B. brevis*. Його застосування обумовлене переважно локальною дією проти грампозитивної мікрофлори (Lang, & Staiger, 2016). Потреба у тиротрицині як фармакологічному засобі зумовлена декількома факторами:

1. Зростанням резистентності до антибіотиків

Збільшення кількості випадків бактеріальних інфекцій, збудники яких демонструють стійкість до широкого спектра антибіотиків, робить необхідним використання альтернативних засобів, зокрема місцевих антимікробних препаратів. Тиротрицин має унікальний механізм дії — він порушує цілісність цитоплазматичної мембрани бактерій, що ускладнює формування резистентності до нього (Mancuso et al, 2021).

2. Безпечне місцеве застосування

На відміну від системних антибіотиків, тиротрицин не всмоктується через слизові оболонки, що мінімізує ризик побічних ефектів і дає змогу безпечно використовувати його при інфекціях ротової порожнини, горла, шкіри, при гінекологічних захворюваннях (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

3. Потреба у швидкодіючих місцевих засобах для лікування ЛОР-захворювань

У практиці отоларингології тиротрицин часто застосовується у складі комбінованих препаратів (наприклад, лідокаїн + тиротрицин) для лікування ангіни, фарингіту, тонзиліту та стоматиту. Це забезпечує не лише антибактеріальну, але й знеболювальну дію (Essack et al, 2019).

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костюк М.С.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					24	71
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

4. Використання у ветеринарній медицині та стоматології

Тиротрицин все частіше використовується як компонент профілактичних або терапевтичних засобів у ветеринарії, а також у стоматологічних засобах — мазях, розчинах для полоскання, пастах, що обумовлює попит з боку суміжних галузей охорони здоров'я (Tyrothricin (CAS 1404-88-2), n.d.).

5. Зростання попиту на природного походження антибіотики

Споживачі все більше віддають перевагу препаратам природного походження. Тиротрицин, як антибіотик, отриманий з *B. brevis*, відповідає цим очікуванням, що відкриває перспективи його використання у виробництві біопрепаратів, у тому числі для створення косметичних засобів із антисептичною дією (Lang, & Staiger, 2016).

6. Промислова потреба у виробництві антисептичних препаратів

Розширення лінійки безрецептурних засобів для боротьби з інфекціями верхніх дихальних шляхів, потреба у швидкій санації порожнини рота (особливо під час вірусних епідемій) стимулюють зростання потреби у сировині для виробництва ефективних місцевих антибактеріальних препаратів, таких як тиротрицин (Lang, & Staiger, 2016).

Тиротрицин, як природний антимікробний засіб місцевої дії, залишається затребуваним компонентом у фармацевтичній, стоматологічній та ветеринарній галузях. Попит на нього постійно підтримується з огляду на зростання інфекційної захворюваності та необхідність безпечних і ефективних локальних засобів (Lang, & Staiger, 2016). Нижче представлено ключові аспекти, що підтверджують ринкову потребу в тиротрицині:

1. Фармацевтичний ринок: попит на місцеві антибактеріальні препарати

Антисептики для горла, пастилки для розсмоктування, спреї для ротової порожнини — це сегмент фармринку, який демонструє стабільне зростання. За даними аналітичної компанії IQVIA, глобальний ринок препаратів для лікування ЛОР-захворювань (безрецептурні засоби) оцінюється у понад 5 млрд доларів США, з щорічним зростанням у межах 5–7%. Значну частку займають

комбіновані засоби з антисептиками, де тиротрицин часто використовується поряд з лідокаїном, хлоргексидином, бензокаїном (Markitwired, 2024).

Приклад препарату — Граміцидин С або Трахісан (Gramicidin C, Tyrothricin) — успішно продається у понад 30 країнах. У Німеччині, Австрії та Швейцарії частка таких препаратів становить до 15% сегменту ЛОР-засобів без рецепта (Robertson, 2023).

2. Попит у стоматології та профілактичній медицині

Стоматологічні препарати на основі тиротрицину — мазі, розчини, гелі — мають значення для лікування гінгівітів, пародонтитів, стоматитів. За оцінками Allied Market Research, ринок засобів для лікування захворювань ротової порожнини оцінювався у 18,9 млрд доларів США у 2022 році, з прогнозованим зростанням до 30 млрд доларів до 2032 року. Компоненти природного походження мають перевагу з точки зору довіри споживача — зростає попит на антибіотики, що не спричиняють системної дії (Markitwired, 2024).

3. Сегмент натуральних антибіотиків та екологічно чистої фармації

Споживчі тренди останнього десятиріччя сприяють популяризації біопрепаратів, зокрема антибіотиків природного походження. Тиротрицин, отриманий шляхом біосинтезу з *B. brevis*, чудово відповідає критеріям "натуральності" та "біологічної безпеки". В Європі та Північній Америці це стало додатковою перевагою для включення тиротрицину до складу засобів, що позиціонуються як "зелені" або "біо" (Lang, & Staiger, 2016).

4. Ветеринарний сегмент

У ветеринарній медицині тиротрицин застосовується для обробки ран, лікування шкірних інфекцій, профілактики у післяопераційний період. Сучасні тенденції розвитку ветеринарної фармацевтики (особливо в країнах ЄС, США, Бразилії та Китаї) включають поступове обмеження синтетичних антибіотиків і перехід на натуральні замінники, зокрема у лікуванні дрібних домашніх тварин і в органічному тваринництві. За прогнозами ResearchAndMarkets, ринок ветеринарних антибіотиків сягне 15,3 млрд доларів США до 2030 року, з

постійним інтересом до природних альтернатив (Tyrothricin (CAS 1404-88-2), n.d.).

5. Український ринок та локальні перспективи

В Україні попит на тиротрицин стабільно підтримується завдяки популярності комбінованих безрецептурних препаратів для горла. Виробництво препаратів на основі тиротрицину може мати хорошу економічну перспективу з огляду на:

- наявність мікробіологічних лабораторій і біофармацевтичних підприємств;
- потребу в імпортозаміщенні антисептичних препаратів;
- зростаючий попит на натуральні засоби лікування серед українських споживачів.

Потреба у тиротрицині як активному антимікробному компоненті має стійку ринкову основу, що підтверджується:

- зростанням частоти ЛОР-інфекцій;
- попитом на препарати локальної дії;
- переорієнтацією фармацевтичного ринку на біологічно активні природні засоби;

Це створює передумови для активізації досліджень, оптимізації біотехнологій отримання тиротрицину та розширення сфери його застосування.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Гострий тонзиліт, або ангіна, — це запалення піднебінних мигдаликів, спричинене переважно бактеріальною (часто стрептококовою) або вірусною інфекцією. Захворювання супроводжується болем у горлі, лихоманкою, збільшенням шийних лімфатичних вузлів, загальною слабкістю та характерними нальотами на мигдаликах. Найбільш небезпечними є бактеріальні форми ангіни, особливо стрептококова, оскільки вони можуть призводити до ускладнень — ревматизму, гломерулонефриту та серцевих уражень (Anderson, 2023).

За останні роки гострий тонзиліт залишається однією з найбільш поширених інфекцій серед дітей і дорослих в Україні :

- Щорічна захворюваність в Україні перевищує 1 мільйон випадків, що становить близько 5–10% населення (Kindheart, 2023).
- Найвища захворюваність реєструється серед дітей віком від 5 до 15 років, які становлять основну групу ризику (Тонзиліт, n.d.).
- У міських умовах захворюваність є вищою через більшу щільність населення та контактність.
- Часто тонзиліт виникає як ускладнення або компонент гострої респіраторної вірусної інфекції (ГРВІ).

Висока поширеність ангіни серед дітей створює високе навантаження на систему охорони здоров'я, зокрема на первинну медичну допомогу. Поширене самолікування антибіотиками, що посилює проблему антибіотикорезистентності. В умовах війни та зниження доступу до своєчасної медичної допомоги зростає ризик ускладнень та хронізації захворювання (Kindheart, 2023).

З огляду на локалізовану бактеріальну природу захворювання та тенденцію до розвитку резистентності до системних антибіотиків, актуальною є потреба у місцевих антисептиках з бактеріоцидною дією, таких як тиротрицин (Tyrothricin (CAS 1404-88-2), n.d.).

- Тиротрицин діє безпосередньо на патоген у вогнищі інфекції.
- Має активність проти грампозитивних бактерій, зокрема β -гемолітичного стрептокока групи А (*Streptococcus pyogenes*) — основного збудника бактеріального тонзиліту.
- Застосовується у формі таблеток для розсмоктування, що зручно у терапії на первинному етапі лікування.

Тож, пропонується розрахувати біотехнологічне виробництво для одержання субстанції тиротрицину з метою виробництва таблеток для розсмоктування для лікування гострого тонзиліту (ангіни).

За даними 2023 року на ангіну хворіє більше 1 мільйона українців, що становить близько 5-10% від загального населення (Kindheart, 2023). Для подальших розрахунків пропонується використовувати середню межу, а отже –

7,5% від населення. За оцінками МВФ, населення України в 2025 році складає 32,9 млн осіб (Жирий, 2025). Тож, кількість населення, що хворіє на ангіну становить:

$$32\,900\,000 \times 0,075 = 2\,467\,500 \text{ людей}$$

За інструкцією до препарату Трахісан (<https://tabletki.ua/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D1%85%D0%B8%D1%81%D0%B0%D0%BD/237/>), добова доза прийому таблеток для дітей від 4 років становить 6 шт, а для дітей від 12 років та дорослих – 8 шт. Для малюків таблетки приймати не рекомендується через потребу у розсмоктуванні.

Нажаль, окремої вікової статистики щодо групи дітей від 4 до 12 років немає. Проте, можемо припустити приблизну кількість. Відомо, що кількість дітей до 18 років в віковій структурі України становить близько 15% (Ланда & Ревук, 2024). З врахуванням того, що старшого населення переважно більше, припускаємо, що вікова група дітей від 4 до 12 років буде складати всього 10%. Тож, зважаючи на це, кількість дітей якій потрібен препарат на основі тиротрицину для лікування ангіни становить:

$$2\,467\,500 \times 0,1 = 246\,750 \text{ дітей}$$

Тоді, вікова група від 12 років становитиме:

$$2\,467\,500 - 246\,750 = 2\,220\,750 \text{ людей}$$

Тривалість лікування Трахісаном становить від декількох до 5 діб. Тому, пропонується розрахувати максимальну потребу з врахуванням вікових категорій, що було вище зазначено. Розрахунок показано в табл.3.1.

Таблиця 3.1.

Розрахунок потреби в тиротрицині

Вікова група	Тривалість курсу	Кількість таблеток на добу	Кількість людей по віковій групі	Необхідна кількість таблеток на курс	Кількість тиротрицину в 1 таблетці	Потрібна кількість тиротрицину
Від 4 до 12 років	5 діб	6 шт	246 750 людей	7 402 500 шт	1 мг	≈7,403 кг
Від 12 років і старше		8 шт	2 220 750 людей	88 830 000 шт		88,83 кг
Всього			2 467 500 людей	96 232 500 шт	-	≈96,233 кг

Враховуючи наявність на ринку лише одного лікарського засобу, що містить тиротрицин, який має лікарську форму таблеток для розсмоктування, пропонується забезпечувати лише 50% від зазначеної потреби, тобто забезпечити близько 48,1 кг антибіотику.

Враховуючи концентрацію антибіотику в культуральній рідині (594,5 мг/л), кількість культуральної рідини на рік становитиме:

$$\frac{48\,100}{594,5} \approx 81 \text{ м}^3$$

Враховуючи те, що субстанцію пропонується використовувати для виробництва лікарського препарату, маємо врахувати кількість втрат при виділенні та очищенні, які будуть становити близько 40%. Тоді, річна потреба в культуральній рідині становитиме:

$$\frac{81}{(1 - 0,4)} = 135 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для одержання 135 м³ культуральної рідини приймаємо, що необхідно 330 робочих трудоднів (Т_{рд}). Тоді, відповідна кількість на добу культуральної рідини (V_д) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 135 / 330 \approx 409 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість культуральної рідини за один виробничий цикл, (V_{крц}):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 409 \cdot 151 / 24 \approx 2830 \text{ л},$$

де T_{цф} - цикл роботи ферментера, що складається з таких етапів: миття та ретельний огляд виробничого обладнання – 1,5 год, визначення герметичності виробничого обладнання – 0,5 год, попередній підігрів та обов'язкова стерилізація усього необхідного обладнання – 1,5 год, зменшення температури у ферментері до прийнятої – 1 год, подання поживного середовища до апарату – 1,5 год, подання посівного матеріалу до ферментеру – 0,5 год, виробничий процес культивування – 144 год, та перекачування культуральної рідини до

збірнику на зберігання – 0,5 год, і становить 151 години. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

Тепер, маючи попередні дані, можна визначити геометричний об'єм ферментера для отримання 2830 л культуральної рідини. Оскільки обрано аеробні умови, коефіцієнт заповнення становить 0,6. Тоді, геометричний об'єм має бути:

$$V_r = V_{цк}/K_{зап} = 2830/0,6 \approx 4717 \text{ л,}$$

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

Знаючи це, маємо обрати наступний об'єм ферментера $V_{ф} = 5 \text{ м}^3$

При цьому, уточнений коефіцієнт заповнення становить:

$$K_{зф} = V_{цк}/V_{ф} = 2830/5000 = 0,57$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Під час виробничого циклу вдається одержати $V_{кр} = 2921$ л культуральної рідини.

Поживне середовище та рівень посівного матеріалу перед початком виробничого біогенезу є наступними, з урахуванням втрат через крапельний транспорт у витяжному колекторі (10%):

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 2830/(1-0,1) = 3144 \text{ л,}$$

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

Отже, виробниче культивування здійснюється в ферментері з геометричним робочим об'ємом $V_{роб.1} = 3144$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1} = 3144/0,6 = 5240$ л. Найближчим за габаритами та робочим об'ємом є ферментер на $V_{сф} = 5000$ л. Знаючи це, уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 3144/5000 \approx 0,63$$

Коефіцієнт знаходиться у межах норми для ферментерів з аерацією.

Кількість інокуляту, що треба внести у ферментер, відповідає 10% від загального об'єму живильного середовища. Отже, кількість поживного бульйону у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 3144 / (1 + 0,1) \approx 2858,2 \text{ л}$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тепер, знаючи минулі параметри, кількість посівного матеріалу в ферментері становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 3144 - 2858,2 = 285,8 \text{ л}$$

Для одержання 285,8 л враховуємо 10% на краплевинос. Отже, кількість живильного середовища в інокуляторі має бути:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{ф}) = 285,8 / (1 - 0,1) \approx 317 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін} = 317 / 0,6 \approx 528 \text{ л}$.

Найближчим за габаритами та робочим об'ємом є інокулятор $V_{сін} = 500 \text{ л}$. Тепер, уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = V_{роб.2} / V_{сін} = 317 / 500 = 0,63$$

Коефіцієнт перебуває у нормальних ежах при аераційному культивуванні.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{ін}) = 317 / (1 + 0,1) \approx 288,2 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 317 - 288,2 = 28,8 \text{ л}$$

Для одержання 28,8 л враховуємо 10% на краплевинос. Отже, кількість живильного середовища в інокуляторі має бути:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{ф}) = 28,8 / (1 - 0,1) \approx 32 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін} = 32 / 0,6 \approx 53 \text{ л}$.

Найближчим за габаритами та робочим об'ємом є інокулятор $V_{сін} = 50 \text{ л}$. Тепер, уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = V_{роб.2} / V_{сін} = 32 / 50 = 0,64$$

Коефіцієнт перебуває у нормальних ежах при аераційному культивуванні.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{ін}) = 32 / (1 + 0,1) \approx 29,1 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 32 - 29,1 = 2,9 \text{ л}$$

2900 мл посівного матеріалу отримується за допомогою певної кількості колб об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 2900 / (750 \times 0,2) = 19 \text{ шт.}$$

Отже, для стадії приготування інокуляту в колбах на качалках необхідно підготувати 19 колб.

Визначено, що підготовка посівного матеріалу відбувається у 3 стадії, першою з яких є 19 колб, другою – культивування в інокуляторі на 50 л, третьою – культивування в посівному апараті на 500 л. Виробниче культивування здійснюється у ферментері на 5 м³ з вахуванням коефіцієнту заповнення для аерації 0,6.

РОЗДІЛ 4

БІОСИНТЕЗ ТИРОТРИЦИНУ

4.1. Шляхи катаболізму дріжджового екстракту у *Bacillus brevis*

Основним компонентом поживного середовища як для вуглецевого так і для азотного живлення є дріжджовий екстракт та пептон. Хоча в пептоні, за літературними даними, азоту міститься більше, в середовищі його міститься менше, тому пропонується вести схему саме з дріжджового екстракту. Карбон в дріжджовому екстракті представлений у вигляді карбоногідратів клітинної стінки, переважно олігосахаридів манози та у вигляді β -глюкану (Тао et al, 2022). Тож, пропонується вести схему спираючись саме на манозу.

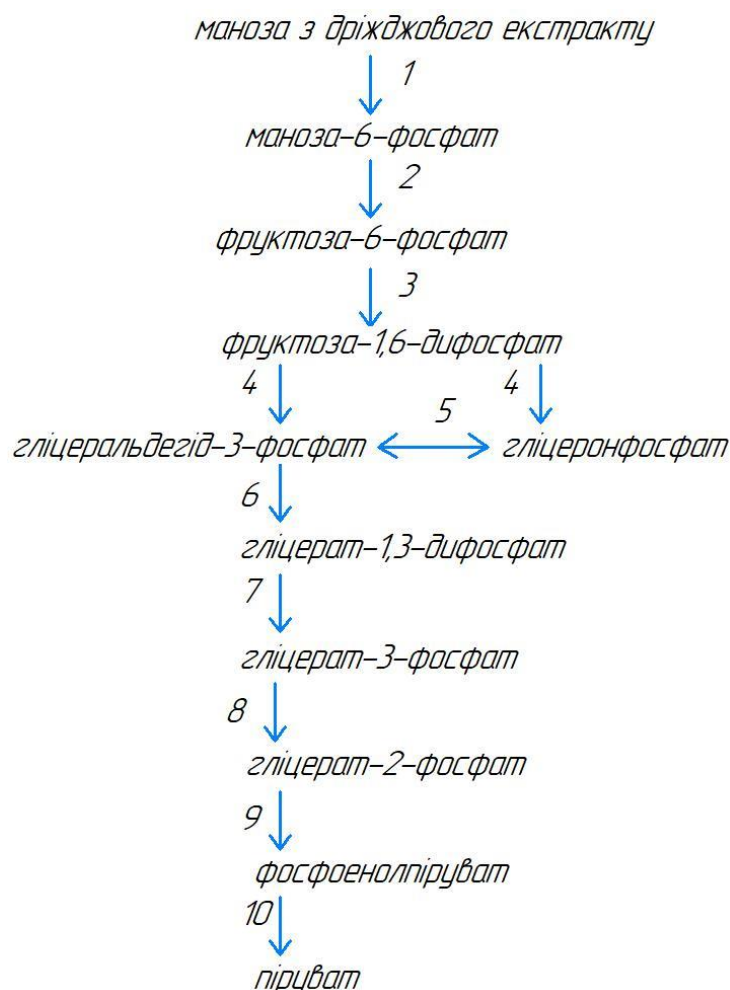


Рис.4.1. Катаболізм манози з дріжджового екстракту до пірувату згідно

					НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Костюк М.С.			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ТИРОТРИЦИНУ		
Перевір.		Стабніков В.П.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркуші
						34	71
					Кафедра БТМ		

бази даних KEGG (<https://www.kegg.jp/pathway/map=bbe00051>;
<https://www.kegg.jp/pathway/bbe00010>)

(1) Катаболізм манози розпочинається з перетворення манози в манозо-6-фосфат. Ця реакція каталізується ферментом гексокіназа (ЕС 2.7.1.1), який переносить фосфатну групу з АТФ на манозу. У результаті утворюється манозо-6-фосфат та АДФ.

(2) Далі манозо-6-фосфат ізомеризується у фруктозо-6-фосфат за участі ферменту фосфоманозоізомераза (ЕС 5.3.1.8). Цей фермент забезпечує перегрупування атомів у молекулі без зміни її складу.

(3) Фруктозо-6-фосфат фосфорилується до фруктозо-1,6-дифосфату за участі ферменту фосфотрикіназа (ЕС 2.7.1.11). У цьому процесі витрачається ще одна молекула АТФ.

(4) Фруктозо-1,6-дифосфат розщеплюється на дві тріозофосфатні молекули — гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат (гліцеронфосфат) — за допомогою ферменту альдолаза (ЕС 4.1.2.13).

(5) Дигідроксиацетонфосфат (гліцеронфосфат) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат під дією ферменту тріозофосфатізомераза (ЕС 5.3.1.1). У результаті на цьому етапі утворюються дві молекули гліцеральдегід-3-фосфату.

(6) Гліцеральдегід-3-фосфат окиснюється до 1,3-бісфосфогліцерату ферментом гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (ЕС 1.2.1.12). У цій реакції відновлюється НАД⁺ до НАДН, а також приєднується неорганічний фосфат.

(7) 1,3-Бісфосфогліцерат перетворюється у 3-фосфогліцерат за допомогою ферменту фосфогліцераткіназа (ЕС 2.7.2.3), з одночасним синтезом АТФ з АДФ.

(8) Далі 3-фосфогліцерат ізомеризується у 2-фосфогліцерат під дією фосфогліцератмутази (ЕС 5.4.2.11).

(9) 2-Фосфогліцерат дегідратується до фосфоенолпірувату ферментом енолаза (ЕС 4.2.1.11), при цьому вивільняється одна молекула води.

(10) На завершальному етапі фосфоенолпіруват перетворюється у піруват за участі ферменту піруваткіназа (ЕС 2.7.1.40), що супроводжується утворенням ще однієї молекули АТФ.

У результаті повного шляху катаболізму однієї молекули манози через гліколіз до пірувату утворюються дві молекули пірувату, а також НАДН та АТФ, які можуть бути використані клітиною у подальших енергетичних чи анаболічних процесах.

4.2. Біотрансформація дріжджового екстракту в тиротрицин

Зважаючи на біохімічний склад тиротрицину можна зробити деякі висновки. Цей антибіотик складається з двох частин – тироцидину в переважній більшості та граміцидину. Це пептидні антимикробні речовини, які складаються переважно з амінокислот шляхом їх циклізації. До складу тироцидину входить: валін, орнітин, лейцин, фенілаланін, пролін, триптофан, аспарагін, глютамін, тирозин. До граміцидину входить валін, гліцин, аланін, лейцин та триптофан (Tang et al, 1992). Знаючи ці дані, робимо висновок, що на схемі біосинтезу має бути висвітлено синтез наступних компонентів: валін, орнітин, лейцин, фенілаланін, пролін, триптофан, аспарагін, глютамін, тирозин, гліцин та аланін.

Перша реакція перетворення розпочинається з пірувату. Піруват трансамінується до аланіну.

Піруват за участі комплексу піруватдегідрогенази перетворюється на ацетил-КоА, який вступає у цикл трикарбонових кислот (ЦТК):

- Ацетил-КоА конденсується з оксалоацетатом з утворенням цитрату.
- Цитрат ізомеризується до ізоцитрату.
- Ізоцитрат дезамінується до 2-оксоглутарату.
 - 2-оксоглутарат трансамінується до глютамату, з якого утворюються:
 - Глутамін
 - Пролін

- Глутамат-напівальдегід, який бере участь у синтезі:
 - Орнітину
- З глутамату також утворюється карбамоїл-фосфат, що бере участь у синтезі орнітину.

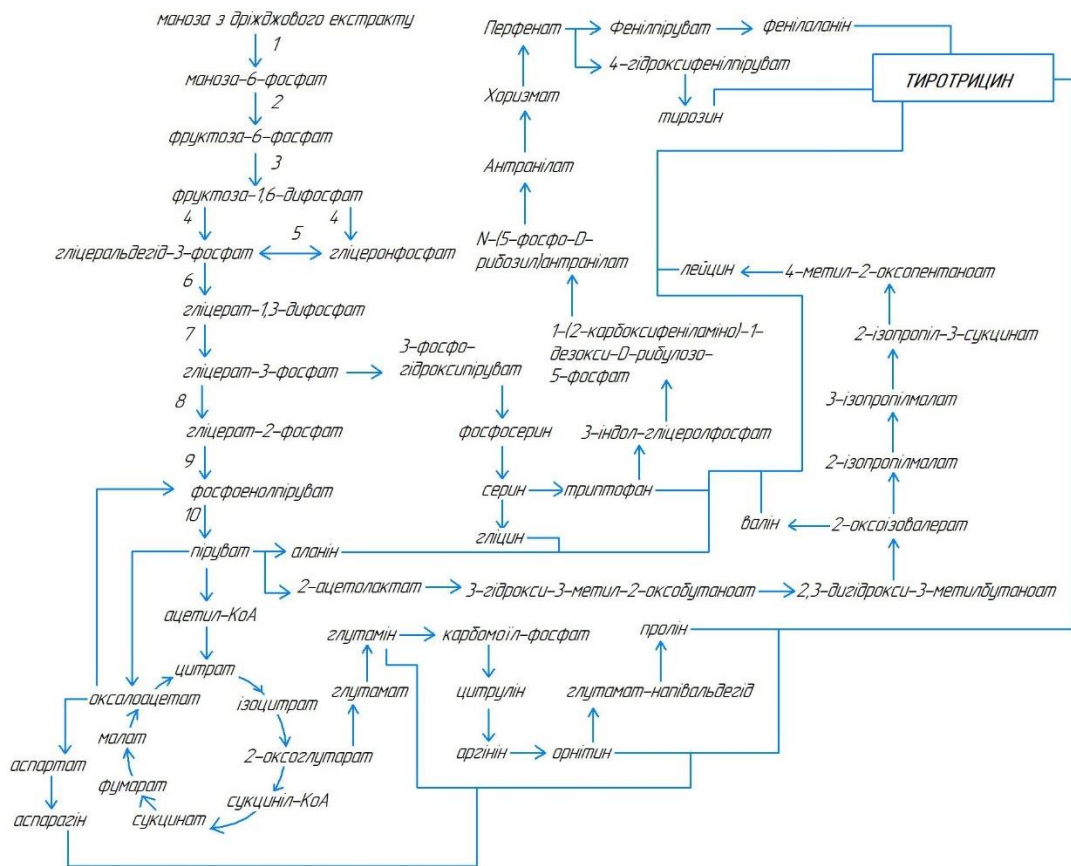


Рис.4.2. Біотрансформація манози з дріжджового екстракту до тиротрицину

- 2-оксоглутарат перетворюється на сукциніл-КоА, далі:
 - Сукцинат → фумарат → малат → оксалоацетат
 - Оксалоацетат трансамінується до аспартату, з якого утворюється аспарагін.

Піруват бере участь у синтезі розгалужених амінокислот:

- Піруват → 2-ацетолактат
 - 2-ацетолактат → 3-гідрокси-3-метил-2-оксобутаноат

- З нього утворюються:
 - Валін через проміжну сполуку 2-оксоізовалерат
 - Лейцин через 4-метил-2-оксопентаноат
 - Ізолейцин через:
 - 2,3-дигідрокси-3-метилпентаноат
 - 2-ізопропилмалат
 - 3-ізопропилмалат
 - 2-ізопропил-3-сукцинат

Інша гілка починається від фосфоенолпірувату (ФЕП):

- ФЕП → 3-фосфогідроксипіруват → фосфосерин
 - З фосфосерину утворюються:
 - Серин
 - Гліцин
 - Триптофан через 3-індол-гліцерофосфат

Фосфоенолпіруват вступає в шлях шікімату разом з еритрозо-4-фосфатом, утворюючи хоризмат:

- Хоризмат → антранілат → N-(5-фосфо-D-рибозил)антранілат → триптофан
- Хоризмат → префенат:
 - Префенат → фенілпіруват → фенілаланін
 - Префенат → 4-гідроксифенілпіруват → тирозин

Фенілаланін, тирозин, триптофан, лейцин, валін та інші амінокислоти є попередниками у синтезі тиротрицину – антибіотика.

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для біотехнологічного одержання тиротрицину культивування *B. brevis* зазвичай проводиться у контрольованих умовах глибинного аеробного ферментування, що є найефективнішим способом з огляду на фізіологічні властивості даного мікроорганізму. *B. brevis* — це облигатно аеробна спороутворююча бактерія, яка потребує високого рівня насичення середовища киснем для інтенсивного росту та синтезу вторинних метаболітів, зокрема тиротрицину. Саме тому перевага надається глибинному культивуванню з активною аерацією (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).

Оптимальним типом біореактора для такого процесу є аеробний ферментер з механічним перемішуванням, обладнаний лопатевою або турбінною мішалкою, системами для подачі стерильного повітря, регулювання температури, рН та рівня розчиненого кисню. Застосування такого ферментера забезпечує:

- однорідність середовища, що важливо для стабільного росту клітин;
- ефективну аерацію і перемішування, необхідні для підтримки високої біомаси та активності синтезу тиротрицину;
- можливість моніторингу та контролю процесу в режимі реального часу (DO, рН, температура, піна тощо);
- стерильність процесу, що запобігає контамінації.

Для забезпечення тривалого виробництва антибіотика можливе також застосування періодичного режиму культивування, що дозволяє досягати пікового рівня тиротрицину в стаціонарній фазі росту клітин. У промислових умовах перевага часто надається періодичному культивуванню, яке є

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Костюк М.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 5.. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					39	71
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

технологічно простішим у масштабуванні та стандартизації (Stauss-Grabo, Atiye, Le, & Kretschmar, 2014).



Рис.5.1. Ферментер об'ємом 5000 л від компанії SYSBIOTECH GmbH (Industrial-scale Fermenter 1000-5000L - Sysbiotech, 2018)

Ферментер об'ємом 5000 літрів від австрійської компанії SYSBIOTECH GmbH призначений для промислового культивування мікроорганізмів, зокрема бактерій, дріжджів та грибів. Він виготовлений з високоякісної нержавіючої сталі марки AISI 316L з внутрішньою обробкою поверхні до $Ra < 0,8$ мкм (або $Ra < 0,4$ мкм за запитом), що забезпечує стерильність і легкість очищення (Industrial-scale Fermenter 1000-5000L - Sysbiotech, 2018).

Ферментер оснащений автоматизованою системою керування C-BIO2™, яка дозволяє інтегрувати обладнання в єдину виробничу лінію та здійснювати моніторинг і контроль процесу з одного комп'ютера. Система підтримує функції CIP (очищення на місці) та SIP (стерилізація на місці), відповідає стандартам cGMP та GAMP, і може бути адаптована під специфічні вимоги користувача, включаючи встановлення додаткових сенсорів або зміну типу мішалки (Industrial-scale Fermenter 1000-5000L - Sysbiotech, 2018).

Усі трубопроводи встановлені на єдиній рамі з нержавіючої сталі, що спрощує доступ до основних технічних вузлів ферментера та полегшує обслуговування (Industrial-scale Fermenter 1000-5000L - Sysbiotech, 2018).

Вибір способу культивування та типу ферментера ґрунтується на фізіолого-біохімічних особливостях *B. brevis* як продуцента, а також на вимогах до процесу синтезу тиротрицину — як до аеробного, контрольованого, стерильного та масштабованого біопроцесу .

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

У процесі біотехнологічного культивування *B. brevis* для одержання тиротрицину ключовим є забезпечення стабільного та стерильного постачання повітря, що необхідне для життєдіяльності аеробного мікроорганізму. Аераційне повітря виконує не лише роль джерела кисню, але й є потенційним джерелом контамінації, тому його попередня підготовка є обов'язковим етапом у побудові надійного технологічного процесу (Карлаш, 2022).

Обробка аераційного повітря включає кілька етапів, але найважливішими з них є стерилізація повітря (через фільтрацію), зволоження, а за потреби — зниження вмісту пилу та органічних домішок. Для стерилізації повітря найчастіше використовуються гідрофобні мембранні фільтри (0,2 мкм), які не пропускають бактерії, спори та грибки, але забезпечують достатню пропускну здатність навіть при високому навантаженні (Карлаш, 2022).

Вибір кінцевої стадії підготовки — стерильна фільтрація повітря безпосередньо перед входом у ферментер — зумовлений такими факторами:

- *B. brevis* є облігатно аеробною бактерією, яка чутлива до змін умісту кисню;
- наявність забруднюючих мікроорганізмів у повітрі здатна не лише знизити продуктивність процесу, але й повністю зруйнувати біосинтез тиротрицину;
- фільтрація забезпечує стерильність процесу без потреби в термічній обробці повітря, що зменшує енергетичні витрати.

Також у промислових установках часто додається попередній ступінь очищення повітря — через багаторівневі фільтри (наприклад, НЕРА, вугільні, грубі фільтри), які затримують пил, аерозолі й органічні пари перед стерильним фільтром (Карлаш, 2022).

Вибір стадії стерильної фільтрації аераційного повітря є критично важливим для забезпечення мікробіологічної чистоти, стабільності культивування *B. brevis* та ефективного синтезу тиротрицину в контрольованих умовах (Карлаш, 2022).

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Забезпечення належного санітарного режиму при культивуванні *B. brevis* для одержання тиротрицину є критично важливою умовою запобігання мікробному обміненню середовища, обладнання та персоналу. Особливої уваги потребують мийні засоби для обладнання (ферментери, резервуари, трубопроводи) та дезінфікуючі засоби для твердих поверхонь (підлога, стіни, столи), а також засоби для гігієни рук персоналу.

Для ефективного очищення біореакторів, де відбувається синтез тиротрицину, використовують переважно лужні мийні засоби, оскільки вони добре розчиняють білкові та жирові залишки, а також мають відносно низьку корозійну дію при відповідній концентрації.

Таблиця 5.1.

Порівняння різних миючих засобів

Назва засобу	Склад/Тип	Дія	Переваги	Недоліки
Neomoscan 103	Лужний, на основі NaOH + ПАР	Видаляє жирові, білкові та мікробні залишки	Ефективний при низьких температурах	Не сумісний з алюмінієм
Divosan CIP A1	Лужний концентрат	Видалення органічних речовин з обладнання	Підходить для CIP-мийки	Необхідна ретельна промивка
Topax 66	Високолужний із хелатами	Ефективний проти біоплівки	Сумісний із нержавіючою сталлю	Висока агресивність до шкіри
P3-topax 91	Лужний з інгібіторами корозії	Ефективний для всіх типів забруднень	Знижена корозійність	Вимагає точного дозування

Примітка (посилання на дез.засоби): Neomoscan 103 -

<https://beercooler.com.ua/%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F/%D1%81%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%BA%D0%B0-%D0%B8-%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1>

https://bs24.com.ua/catalog/profesiyna_khimiya/zasoby_ochyshchennya_dlya_vyrobnystva/dezinfikuyuchiy_zasib-diversey-divosan-etha-plus-5-/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=bs24&utm_content=diversey&utm_term=&utm_source=1&utm_campaignid=17270678639&utm_gclid=Cj0KCQjwXo_CBhDbARIsADWpDH7zvLbFvRgZkMgYRLCTbv1uuSniZn4Z_Jnbho4mM39lhHDpzD6zI1kaAgW1EALw_wcB, Topax 66 - <https://pivden-profit.com.ua/ua/p1178527375-pennoe-moyuschee-dez.html>, P3-topax 91 - <https://www.sipaec.ch/fr-fr/p3-topax-91-bidon-19-kg-12-12-12-adr8-iii-c9-un-17-1e129--105016>

Усі ці мийні засоби рекомендовано використовувати в рамках СІР-системи, з контролем температури, концентрації та тривалості експозиції.

Для поверхонь у виробничому приміщенні важливо обирати дезінфектанти широкого спектра дії, включно з бактеріцидною, спороцидною та фунгіцидною активністю. Особлива увага приділяється несумісності з мийними засобами та залишковій токсичності.

Таблиця 5.2.

Порівняння різних дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Діюча речовина	Спектр дії	Переваги	Недоліки
Біодез-Плюс	ЧАС + глутаровий альдегід	Бактерії, віруси, гриби, спори	Висока ефективність, тривала дія	Потребує ретельного змивання
Санітаб	Надоцтова кислота	Бактерії, спори	Біорозкладний, не утворює резистентності	Має сильний запах
Дезактін	Гіпохлорит натрію	Широкий спектр	Дешевий, швидкий ефект	Може викликати корозію
Incidin Extra	ЧАС + ізопропанол	Бактерії, віруси	Не потребує змивання, швидка дія	Вибухонебезпечний у високих концентраціях

Примітка: Біодез-Плюс - <https://prom.ua/ua/p6083185-biodez.html>, Санітаб - <https://prom.ua/ua/p1782819545-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dlya.html>, Дезактін - <https://apteka911.ua/ua/shop/poroshok-dlya-dezinfektsiyi-dezaktin-1-kg-p27126>, Incidin Extra - https://maccabi.com.ua/ua/p689956026-intsidin-ekstra-incidin.html?srsId=AfmBOoqssWWE4r17kACZP8XnD9Kr_3_N-IDKDwPDzH-ykLqbyy-Y7Gvn

Ці засоби рекомендовано чергувати або комбінувати з урахуванням ротаційної стратегії, щоб запобігти розвитку мікрофлори, стійкої до дезінфекції.

Розрахунок мийчих та дезінфікуючих засобів наведено нижче (див. табл.5.6). Згідно розрахунків логічно обрати Neomoscan 103 та Divosan СІР А1 як мийчі засоби, та Біодез-Плюс та Incidin Extra як дезінфікуючі через їх дешевизну.

Гігієна рук є ключовим бар'єром проти перехресного обмінення обладнання і середовища. Обираються швидкодіючі антисептики на основі спиртів з доглядовими компонентами.

Таблиця 5.3

Наведення різних засобів для дезінфекції рук

Назва засобу	Діюча речовина	Особливості
Sterillium®	2-пропанол + доглядові добавки	Антисептик широкого спектра, зволожує
АХД 2000	Етанол 70%	Не залишає слідів, швидко висихає
Desderman pure	Ізопропанол + доглядові компоненти	Має пролонговану дію
Manisoft	Комбінований антисептик	Підходить для частого використання

Для обробки рук пропонується обрати Desderman pure, оскільки він містить не лише доглядові компоненти, а й має пролонговану дію.

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво тиротрицину триває 330 робочих днів та включає використання наступного обладнання: ферментера місткістю 5000 л, інокулятора на 500 та 50 л, ємностей для підготовки та стерилізації компонентів живильного середовища (15, 50, 100, 300, 500 л відповідно), качалок, а також боксу та лабораторного обладнання.

Процес організований у спеціалізованих приміщеннях, зокрема у виробничому цеху біосинтезу та лабораторії, де розміщені автоклави, бокс, термостати, холодильники й апаратура для моніторингу параметрів процесу.

На рис. 5.1 представлено орієнтовне планування виробничої зони, яке враховує габарити обладнання та забезпечує необхідні відстані між апаратами (не менше 1 м) і від стін (1–1,5 м).

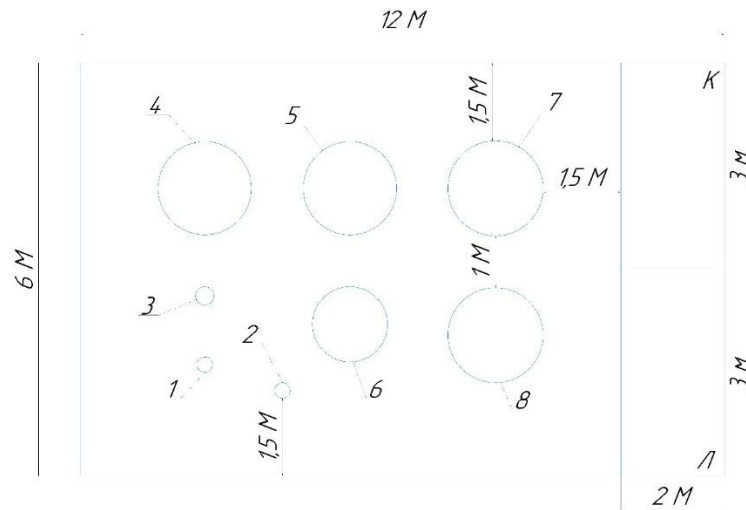


Рис.5.1. План приміщення для виробництва тиротрицину

1 – збірник об’ємом 50 л, 2 – інокулятор об’ємом 50 л, 3 – реактор об’ємом 15 л, 4 – реактор об’ємом 300 л, 5 – посівний апарат об’ємом 500 л, 6 – реактор об’ємом 100 л, 7 – реактор об’ємом 3000 л, 8 – ферментер об’ємом 5000 л.

Загальний об’єм обладнання, включаючи ферментери, інокулятори та інші апарати для вирощування посівного матеріалу й виробничого біосинтезу, становить 9,015 м³.

Для підтримання санітарних умов у виробничих приміщеннях щодня виконується миття підлоги, що за 300 робочих днів відбувається 300 разів. Раз на місяць проводиться генеральне прибирання, яке включає очищення стін, підлоги, вікон та іншого обладнання, тобто загалом 11 разів на рік.

Для визначення необхідної кількості мийних і дезінфікуючих засобів розраховується загальна площа поверхонь, що підлягають обробці, з урахуванням площі підлоги виробничого приміщення та стін на висоту 2,5 м.

Площа підлоги становить 72 м², площа стін – 130 м², загальна площа обробки – $72 + 120 = 192$ м².

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі приміщень для виробництва закваски для ряжанки

Приміщення	Площа приміщення, м ²	Площа стін, м ²
Виробничий цех	60	80
Лабораторія та качалочна	20	50
Всього	80	130

Зведені дані щодо площі поверхонь, що підлягають миттю, наведено в табл. 5.4.

Кількість виробничих циклів для біосинтезу тиротрицину становить 48.

Оскільки миття обладнання проводиться перед кожним циклом, загальна кількість процесів миття за весь період виробництва становить 49 (включаючи додаткове миття після завершення останнього циклу).

Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$49 * 9,015 = 441,735 \text{ м}^3$$

Таблиця 5.4

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	9,015	49	441,735
Підлога	80	330	26 400
Стіни, двері, вікна	130	11	1430

Таблиця 5.5.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва тиротрицину

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Neomoscan 103	Обладнання	2	441,735	88 348	90 ¹	1,8	159 026,4
Divosan CIP A1		0,5			331 ²	1,66	146 657,7
Торак 66		2			155 ³	3,1	273 878,8
P3-торак 91		3			258 ⁴	7,74	683 813,5
Біодез-Плюс	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	27830	2783	324 ⁵	0,33	918,4
Санітаб		0,3 за активним хлором			325 ⁶	1,22	3395,26
Дезактін		0,5			448,8 ⁷	2,25	6261,75
Incidin Extra		0,5			365 ⁸	1,83	5092,9

Примітка:

1

<https://beercooler.com.ua/%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F/%D1%81%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%BA%D0%B0-%D0%B8-%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%8B/neomoscan-sepa/>, 2

https://bs24.com.ua/catalog/profesiyna_khimiya/zasoby_ochyshchennya_dlya_vyrobnnytstva/dezinfikuyuchiy-zasib-diversey-divosan-etha-plus-5-l/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=bs24&utm_content=diversey&utm_term=&gad_source=1&gad_campaignid=17270678639&gbraid=0AAAAoNDaB1cwaBPcyW-Bc0PSIPqfo6uL&gclid=Cj0KCQjwXo_CBhDbARIsADWpDH7zvLbFvRgZkMgYRLCTbv1uuSniZn4Z_Jnbho4mM39lhHDpzD6zI1kaAgW1EALw_wcB, 3

<https://pivden-profit.com.ua/ua/p1178527375-pennoe-moyuschee-dez.html>, 4 - <https://www.sipaec.ch/fr-fr/p3-topax-91-bidon-19-kg-12-12-12-adr8-iii-c9-un-17-1e129--105016>, 5 - <https://prom.ua/ua/p6083185-biodez.html>, 6 - <https://prom.ua/ua/p1782819545-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dlya.html>, 7 -

<https://apteka911.ua/ua/shop/poroshok-dlya-dezinfektsiyi-dezaktin-1-kg-p27126>, 8 - https://maccabi.com.ua/ua/p689956026-intsidin-ekstra-incidin.html?srltid=AfmBOoqssWWE4r17kACZP8XnD9Kr_3_N-IDKDwPDzH-ykLqbyy-Y7Gvn

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Середовище для накопичення біомаси має наступний склад (г/л):

Пептон – 10,

Порошок яловичого бульйону – 5,

NaCl – 5.

Ділимо це середовище на наступні композиції:

Композиція А: пептон та порошок яловичого бульйону, 120 °С, 20 хвилин, 0,1 МПа.

Композиція Б: NaCl, 131 °С, 40 хвилин, 0,15 МПа.

Перший етап – підготовка та стерилізація поживного середовища для стадій колб. Відповідний розрахунок показано в табл.5.4. Враховуючи те, що на цій стадії потрібно підготувати 2,9 л посівного матеріалу, маємо врахувати, що 10% буде складати змив з пробірок (≈ 300 мл).

Таблиця 5.6.

Поділ на композиції середовища для стадії накопичення біомаси в колбах на качалках

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 2,6 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пептон	10	26	А	1600
Порошок яловичого бульйону	5	13		
Вода	1600 мл			
NaCl	5	13	Б	1000
Вода	1000 мл			

Для підготовки композиції А передбачуємо колбу об'ємом 3 л, а для композиції Б – колбу на 2 л.

Наступний етап – підготовка посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л.

Таблиця 5.7.

Поділ на композиції середовища для стадії накопичення біомаси в інокуляторі об'ємом 50 л

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 29,1 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	10	291	А	28
Порошок яловичого бульйону	5	145,5		
Вода	25,5 л			
Конденсат	≈2,5 л			
NaCl	5	145,5	Б	1,1
Вода	1100 мл			

Композицію А змішуємо в реакторі об'ємом 50 л, а потім стерилізуємо в інокуляторі. Композиції Б готуємо в колбі на 2 л.

Третій етап – підготовка посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 500 л.

Таблиця 5.8.

Поділ на композиції середовища для стадії накопичення біомаси в посівному апараті об'ємом 500 л

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 288,2 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	10	2882	А	280
Порошок яловичого бульйону	5	1441		
Вода	253 л			
Конденсат	≈25 л			
NaCl	5	1441	Б	10,2
Вода	9,3 л			
Конденсат	≈0,9 л			

Композицію А змішуємо в реакторі на 300 л, а потім стерилізуємо в посівному апараті на 500 л. Композицію Б стерилізуємо в реакторі об'ємом 15 л.

Наступною стадією є виробничий біосинтез, де середовище має дещо інший склад (г/л):

Казеїновий пептон – 10,28,

Дріжджовий екстракт – 11,03,

NaCl – 4,62

Тож, ділимо її на наступні композиції:

Композиція А: казеїновий пептон та дріжджовий екстракт, 120 °С, 20 хвилин, 0,1 МПа.

Композиція Б: NaCl, 131 °С, 40 хвилин, 0,15 МПа.

Таблиця 5.9.

Поділ на композиції середовища для виробничого культивування в ферментері об'ємом 5 м³

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 2858,2 л ПС, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	10,28	29,38	А	2800
Дріжджовий екстракт	11,03	31,53		
Вода	2545 л			
Конденсат	≈255 л			
NaCl	4,62	13,2	Б	58,2
Вода	53 л			
Конденсат	≈5,2 л			

Композицію А змішуємо в реакторі на 3000 л, а потім стерилізуємо в ферментері. Композицію Б стерилізуємо в реакторі об'ємом 100 л.

РОЗДІЛ 6
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1.

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник / посилання)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Металева сітка (провідність 1–50 мкм); корпус із сталі, фарбування RAL 7035 (Filter Concept) ¹
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний фільтр ISO ePM10/ePM2.5 (G-клас); плівка із скловолокна, ДНС, противірусний захист (AAF RedPleat) ²
К-3	Компресор	1	Винтовий (масло-інжектований), наприклад Dalgakiran DVK125 — 1320 м ³ /год при 13 бар; вбудований циклонний вхідний фільтр (Mann&Hummel) ³
Т-4 Т-6	Теплообмінник (універсальний: охолоджувач/нагрівач)	1	Роторно-винтовий компресор із водоохолодженням + теплообмінна система охолодження/нагрівання (Compressed Air Challenge) ⁴
Р-5	Ресивер	1	ASME-сертифікований, об'єм залежить від потреб; служить як акумулятор і вторинний теплообмінник (Fluid-Aire Dynamics) ⁵
Ф-7	Головний фільтр очистки стисненого повітря	1	Коалесцентний фільтр (Parker/McMaster-Carr): затримка часток до 0,01 мкм; корпус 316SS (McMaster-Carr) ⁶
Ф-29, Ф-30, Ф-31	Індивідуальний фільтр очистки стисненого повітря	3	Локальні модульні фільтри від Wilkerson: ступені фільтрації до 0,01 мкм для окремих ліній ⁷
Р-8	Реактор об'ємом 50 л	1	BXBIO 50 L Bioreactor: сталевий реактор з контролем температури, рН, DO; Ø300 мм, В ≈ 1700 мм. сертифікати CE/GMP/ISO ⁸
Д-9 Д-13 Д-16 Д-21 Д-25	Дозатор для води	5	Integra DOSE IT: лабораторний перистальтичний дозатор, потік 0.6 мл/хв–5 л/хв, програмування, автоклавування ⁹

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Костюк М.С.			РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					51	71
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Н-10 Н-14 Н-22 Н-28	Насос відцентровий	4	Masterflex центрифужні рішення ATLANTIS/Avantor – з точним потоком, довговічний ¹⁰
I-11	Інокулятор об'ємом 50 л	1	ВХВІО 50 L Bioreactor: сталевий реактор з контролем температури, рН, DO; Ø300 мм, В ≈ 1700 мм. сертифікати CE/GMP/ISO ⁸
P-12	Реактор об'ємом 300 л	1	Sartorius 300 L bioreactor (гнучкість, GMP). Оснащений мішалкою, сорочкою та датчиками контролю швидкості перемішування, розчиненого кисню, температури, рН і т.д. Виконаний зі сталі нержавіючої. 1800 × 1200 × 2400 мм ¹¹
P-15	Реактор-стерилізатор об'ємом 15 л	1	BioFlo 415 лабораторний стерилізатор 15 л. Оснащений мішалкою, сорочкою. Виконаний зі сталі нержавіючої. Ø ≈ 356 мм × В ≈ 1295 мм ¹²
Н-17 Н-26	Насос перистальтичний	2	Watson-Marlow Qdos серія – до 2000 мл/хв при 9 бар, сумісні з біологічними середовищами ¹³
ПА-18	Посівний апарат об'ємом 500 л	1	Sartorius однорозмірний ВРС ~500 л. Оснащений мішалкою, сорочкою та датчиками контролю швидкості перемішування, розчиненого кисню, температури, рН і т.д. Виконаний зі сталі нержавіючої. 1800 × 1200 × 2600 мм ¹⁴
Д-19 Д-23	Дозатор сипучих компонентів	2	Механічний шнековий дозатор ДТЗ-100. Об'єм бункера 400 літрів; Вага дозування: 1 - 15 кг Похибка дозування: 1% ¹⁵
P-20	Реактор об'ємом 3000 л	1	Dakota BioWorx 3000 L pilot-scale. Оснащений мішалкою, сорочкою. Виконаний зі сталі нержавіючої. 1835 × 1443 × 3346 мм ¹⁶
P-24	Реактор-стерилізатор об'ємом 100 л	1	Eppendorf 100 л реактор. Оснащений мішалкою, сорочкою. Виконаний зі сталі нержавіючої. 1450 × 1150 × 2200 мм ¹⁷
Ф-27	Ферментер об'ємом 5 м ³	1	ВХВІО під масштабні виробничі процеси (5 м ³). Оснащений мішалкою, сорочкою та датчиками контролю швидкості перемішування, розчиненого кисню, температури, рН і т.д. Виконаний зі сталі нержавіючої. 1835 × 1443 × 4856 ¹⁸

Примітка: 1 - <https://filter-concept.com/products/air-filtration/air-intake-filter-systems/>, 2 - <https://aafeurope.com/products/coarse-fine-filters/panel-filters/>, 3 - <https://rabin.com/wp-content/uploads/2020/06/10.-Compressed-Air-System-2.pdf>, 4 - <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BPD/Datasheets/dhx-heat-exchanger-data-sheet.pdf>, 5 - <https://fluidairedynamics.com/blogs/articles/everything-you-should-know-about-compressed-air-receiver-tanks>, 6 - <https://www.mcmaster.com/products/inline-air-filters/parker-modular-compressed-air-filters-for-particle-removal/removes-particle-size-down-to~less-than~10~microm/>, 7 - <https://www.mcmaster.com/products/inline-air-filters/removes-particle-size-down-to~less-than~10~microm/din-mount-compressed-air-filters-for-particle-removal/>, 8 - <https://shbxbio.en.made-in-china.com/product/ZwKGUvXVNdKf/China-Automatic-Sterilization-50L-100L-Microbial-Fermenter-Full-Series-of-Bioreactor-Biological-Fermentation-Laboratory-Bioreactor.html>, 9 - <https://www.laboratorynetwork.com/doc/dose-it-0002>, 10 - <https://www.wmfts.com/siteassets/catalog/products/corporate/watson-marlow-pumps/cased-pumps/7206/literature/wd-wmpumps-qdos120-en.pdf>, 11 - [52](https://americanlaboratorytrading.com/lab-</p>
</div>
<div data-bbox=)

[equipment-products/bioreactor-300-l-fermentor-11676/?srsltid=AfmBOooP1FZm9v494InM6bi2Su1fT5a-WK5JtzWyclmPUZhss03_Hq1R](#), 12 - <https://www.somatco.com/BioFlo-415-Fermenter.pdf>, 13 - <https://us-prod2.vwr.com/store/catalog/product.jsp>, 14 - <https://shop.sartorius.com/ww/p/flexsafe-str-500-l-multi-use-doph/FRS126366>, 15 - <https://tehnomashstroy.com.ua/ua/p2217696662-shnekovij-dozaator-sipuchih.html>, 16 - <https://www.dakotabioworx.org/>, 17 - https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/144668_Brochure/New-Brunswick_Fermentors-Bioreactors_Brochure_BioFlo-610_Compact-Mobility.pdf, 18 - <https://bxbio.com/en/About-us.html>

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря надходить через повітрязабірник (ПЗ-1), розташований на висоті 10 метрів. Такий рівень вибрано для мінімізації кількості пилу та біоаерозолів у повітряному потоці.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

На цьому етапі здійснюється первинне видалення пилових частинок і механічних домішок за допомогою фільтра (Ф-2), ефективність якого становить близько 80%.

ДР 1.3. Компресування повітря

Повітря подається в компресор (К-3), де стискається до тиску приблизно 0,4 МПа. У процесі стиснення температура зростає, тож надалі повітря підлягає охолодженню.

ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості

Щоб уникнути мікробного забруднення, повітря охолоджують у теплообміннику (Т-4) до температури 19 °С. Після цього надлишкова волога конденсується у ресивері (Р-5), знижуючи вологість до приблизно 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворенню конденсату на фільтрувальних елементах, охоложене повітря підігривають у теплообміннику (Т-6) до 30 °С.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Далі повітря проходить через головний фільтр (Ф-7), що забезпечує підвищення його чистоти до ефективності очищення на рівні 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

На завершальному етапі повітря фільтрується через індивідуальні

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>				
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Розроб.</i>		<i>Костюк М.С.</i>						<i>54</i>	<i>71</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>							
<i>Реценз.</i>									
<i>Н. Контр.</i>									
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>	

фільтри (Ф-28, Ф-29, Ф-30), встановлені безпосередньо перед інокуляторами та ферментерами. Ці фільтри забезпечують найвищий ступінь очищення — до 99,995%.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 26 г пептону та 13 г порошка яловичого бульйону. Порошки вносять в скляну термостійку колбу об'ємом 3 літри. Скляним мірним циліндром об'ємом 2 л відміряють 1600 мл води питної. Колбу ставлять на мішалку з підігрівом, а в саму композицію вкидають магніт для повного перемішування компонентів. Після цих маніпуляцій, магніт витаскують спеціальною вудкою. Колбу закривають ватно-марлевым корком, ставлять в автоклав, в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 120 °С, 0,1 МПа, тривалість самого процесу – 20 хв.

ДР 2.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 13 г харчової солі. Наважку вносять в скляну термостійку колбу об'ємом 1 літр. Скляним мірним циліндром об'ємом 1 л відміряють 1000 мл води питної. Колбу ставлять на мішалку, а в саму композицію вкидають магніт для повного перемішування компонентів. Після цих маніпуляцій, магніт витаскують спеціальною вудкою. Колбу закривають ватно-марлевым корком, ставлять в автоклав, в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 131 °С, 0,15 МПа, тривалість самого процесу – 40 хв.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 50 л

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 291 г пептону та 145,5 г порошка яловичого бульйону. Порошки вносять в реактор (Р-8) об'ємом 50 літрів. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-9) до зазначеного реактора вливають 25,5 л води

питної. На контрольній панелі вмикають мішалку для повного перемішування компонентів. Після цих маніпуляцій, композиція за допомогою відцентрового насосу (Н-10) композиція переноситься в робочий інокулятор (І-11), в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 120 °С, 0,1 МПа, тривалість самого процесу – 20 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 145,5 г харчової солі. Наважку вносять в скляну термостійку колбу об'ємом 1 літр. Скляним мірним циліндром об'ємом 1 л відміряють 1100 мл води питної. Колбу ставлять на мішалку, а в саму композицію вкидають магніт для повного перемішування компонентів. Після цих маніпуляцій, магніт витаскують спеціальною вудкою. Колбу закривають ватно-марлевым корком, ставлять в автоклав, в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 131 °С, 0,15 МПа, тривалість самого процесу – 40 хв.

ДР 2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 500 л

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2882 г пептону та 1441 г порошка яловичого бульйону. Порошки вносять в реактор (Р-12) об'ємом 300 літрів. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-13) до зазначеного реактора вливають 253 л води питної. На контрольній панелі вмикають мішалку для повного перемішування компонентів. Після цих маніпуляцій, композиція за допомогою відцентрового насосу (Н-14) композиція переноситься в робочий посівний апарат (ПА-18), в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 120 °С, 0,1 МПа, тривалість самого процесу – 20 хв.

ДР 2.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1441 г харчової солі. Наважку вносять в реактор (Р-15) об'ємом 15 літрів. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-16) до зазначеного реактора вливають 9,3 л води питної. На контрольній панелі вмикають мішалку для повного перемішування компонентів. Після цих

маніпуляцій, кришка реактору закривається, в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 131 °С, 0,15 МПа, тривалість самого процесу – 40 хв.

ДР 2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування в ферментері на 5 м³

ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-19) зважують 29,38 кг пептону та 31,53 кг дріжджового екстракту. Порошки вносять в реактор (Р-20) об'ємом 3000 літрів. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-21) до зазначеного реактора вливають 2545 л води питної. На контрольній панелі вмикають мішалку для повного перемішування компонентів. Після цих маніпуляцій, композиція за допомогою відцентрового насосу (Н-22) композиція переноситься в ферментер, в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 120 °С, 0,1 МПа, тривалість самого процесу – 20 хв.

ДР 2.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-23) зважують 13,2 кг харчової солі. Наважку вносять в реактор (Р-24) об'ємом 100 літрів. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-25) до зазначеного реактора вливають 53 л води питної. На контрольній панелі вмикають мішалку для повного перемішування компонентів. Після цих маніпуляцій, кришка реактору закривається, в якому встановлюються наступні параметри стерилізації: температура 131 °С, 0,15 МПа, тривалість самого процесу – 40 хв.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *V. brevis* АТСС 10068 зберігають на агаризованому середовищі МПА при 4°С. Пересів на свіже поживне середовище виконують кожні 2-3 місяці. Всі дослідження з цією культурою проводять в абсолютно асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційні культури, що зберігалися в пробірках з агаром МПА, сіють петлями на чашки Петрі з живильним агаром та інкубували при 37°C протягом 48 годин.

ТП 3.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках

Отримані ізолювані колонії (з ТП 3.2) переносять у пробірки з агаром МПА (одна пробірка використовується для посіву однієї ізолюваної колонії). Інкубаційний період становить 48 годин. Засіяні пробірки поміщають у термостат при 37°C. Чистота культур контролюється під мікроскопом.

ТП 3.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

До колби з композицією А (від ДР 2.1.1.) додають 1 л композиції Б (від ДР 2.1.2.) в асептичних умовах. Перемішують і розливають по 135 мл у 19 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *B. brevis* ATCC 10068, вирощеною на поживному агаровому середовищі МПА, наливають 10 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини за допомогою мікробіологічної петлі, набирають стерильною піпеткою отриману бактеріальну суспензію і вносять її в колбу з поживним середовищем.

Бактерії інкубують у колбах при струшуванні. Умови інкубації: температура - 37°C, швидкість обертання - 180 об/хв, час інкубації - 96 годин. Інкубація проводиться в аеробних умовах. Після інкубації культуру переносять у стерильну 5-літрову колбу для посіву. Концентрація біомаси має становити 4 г/л.

ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л

У стерильний 50-літровий апарат (І-11) для культивування (ПА-12), що містить простерилізовану композицію А (від ДР 2.2.1) вносять в асептичних умовах композицію Б (від ДР 2.2.2). У сорочку апарата подають холодну воду та глуху пару, а температуру середовища підтримують на рівні 37 °С.

Посівний матеріал (ТП 3.4) переносять в апарат у суворо асептичних умовах. Процес інкубації здійснюється за наступних умов: температура - 37 °С, швидкість струшування - 180 об/хв, час інкубації – 72 години. Асептичне повітря

подається з барботера, а відпрацьовані гази відводяться. Концентрація біомаси має становити 4 г/л.

ТП 3.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті на 500 л

У стерильний 500-літровий апарат (ПА-18) для культивування (ПА-12), що містить простерилізовану композицію А (від ДР 2.3.1) вносять в асептичних умовах композицію Б (від ДР 2.3.2) за допомогою перистальтичного насоса (Н-). У сорочку апарата подають холодну воду та глуху пару, а температуру середовища підтримують на рівні 37 °С.

Посівний матеріал (ТП 3.5) переносять в апарат у суворо асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес інкубації здійснюється за наступних умов: температура - 37 °С, швидкість струшування - 180 об/хв, час інкубації – 72 години. Асептичне повітря подається з барботера, а відпрацьовані гази відводяться. Концентрація біомаси має становити 4 г/л.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1. Виробничий біосинтез

До простерилізованого ферментеру (Ф-26), що містить композицію А (від ДР 2.4.1) вносять композицію Б (від ДР 2.4.2) за допомогою перистальтичного насоса. У сорочку апарата подають холодну воду та глуху пару, а температуру середовища підтримують на рівні 37 °С.

Посівний матеріал (з ТП 3.6) переноситься в ферментер в строго стерильних умовах за допомогою труби перетискування. Процес інкубації здійснюється за наступних умов: температура - 37°С, швидкість перемішування - 180 об/хв, час інкубації - 144 годин. Стерильне повітря подається за допомогою барботера, а відпрацьовані гази відводяться.

Культуру культивують до досягнення концентрації біомаси 7,72 г/л та концентрації антибіотику 594,5 мг/л. Одержану культуральну рідину подають у збірник на зберігання для подальшого виділення та очистки тиротрицину.

РОЗДІЛ 8

ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТИРОТРИЦИНУ

Виділення та очищення тиротрицину є трудомісткою справою через його склад, оскільки це двокомпонентний антибіотик, що містить тироцидин та грамїцидин. Через що, дуже багато схем присвячено виділенню та очищенню тої чи іншої фракції. Сучасні дослідження не охоплюють очистку зазначеного цільового продукту, тому пропонується використати схему 1972 року від Bartley та ін.

Клітинну пасту, отриману з 6 літрів середовища AGM (12000 g, 2 хв, при 4 °C), ресуспендували у 200 мл свіжого того ж середовища. Для осадження білків та руйнування клітин додавали трихлороцтову кислоту до кінцевої концентрації 5% мас./об., після чого суміш нагрівали на водяній бані протягом 5 хвилин. Після охолодження проводили центрифугування при 10 000 g протягом 10 хвилин. Осад, що утворився, двічі промивали 40 мл 1% розчину хлориду натрію для видалення залишкових домішок.

Наступним етапом була екстракція тиротрицину. Для цього осад ресуспендували в 40 мл суміші етанолу з 0,2 М хлороводневою кислотою у співвідношенні 9:1 (об./об.) і витримували при перемішуванні протягом 2 годин. Після цього проводили центрифугування при 10 000 g протягом 20 хвилин. Отриманий осад додатково екстрагували 30 мл етанолу впродовж ночі, після чого знову центрифугували. Обидва етанольні супернатанти об'єднували та концентрували шляхом випарювання у вакуумі при температурі 50 °C до кінцевого об'єму 15 мл. Отриману темно-коричневу рідину виливали у 150 мл 1% розчину NaCl і залишали на 3 доби для осадження. Після витримки проводили центрифугування, супернатант декантували, а залишок, що містив тиротрицин, розчиняли у 10 мл етанолу.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Костюк М.С.</i>				<i>РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТИРОТРИЦИНУ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						60	71
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Очищення тиротрицину здійснювали з використанням кислого оксиду алюмінію, який ефективно адсорбує амінокислоти та інші забруднюючі речовини. Для цього оксид алюмінію (Woelm) змішували з 90% етанолом (об./об.) і вносили у скляну хроматографічну колонку діаметром 1 см, оснащену пористим скляним диском (пористість 3), формуючи шар сорбенту товщиною приблизно 1 см. Зразки, попередньо розчинені в 90% етанолі (до 2 мл), наносили на колонку й елюювали 2 мл того ж розчинника. Для прискорення процесу використовували тиск азоту (N₂). За цих умов досягали елюювання 100% тироцидину (1 мг/мл) та 97% граміцидину (1 мг/2 мл), тоді як такі амінокислоти, як мічений фенілаланін-14C, лейцин, триптофан, аргінін та глютамінова кислота, залишалися на колонці.

Для подальшої ідентифікації очищеного матеріалу використовували колонку з Sephadex LH-20 із диметилформамідом як елюентом. Слід проявляти особливу обережність у випадках, коли швидкість включення амінокислоти нижча за 0,05 нмоль/год на мг білка, оскільки це може свідчити про те, що тироцидин не є головною складовою в екстрагованому зразку.

Тож, зважаючи на вище наведене, схему виділення та очищення представлено на рис.8.1.

Схема стадій виділення та очищення тиротрицину:

1. Підготовка клітинної маси

- Центрифугування культуральної рідини

2. Осадження білків та руйнування клітин

- Додавання ТХУК до 5% (мас./об.).
- Нагрівання на паровій бані (5 хв).
- Охолодження.
- Центрифугування при 10 000 g (10 хв).
- Двократне промивання осаду 1% NaCl.

3. Екстракція тиротрицину

- Ресуспендування осаду в 40 мл етанолу + 0,2М HCl (9:1 об./об.), 2 години.
 - Центрифугування при 10 000 g (20 хв).

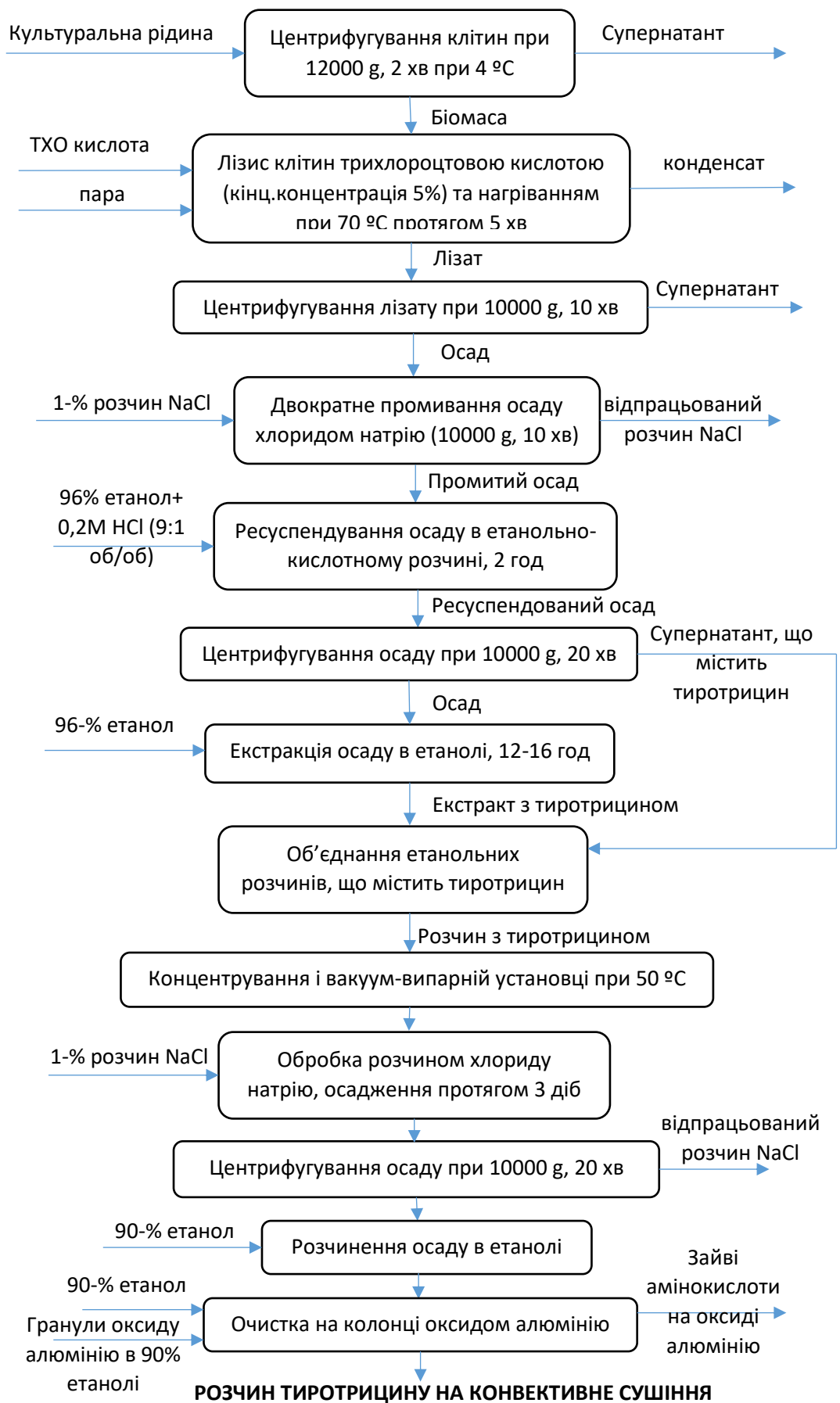


Рис.8.1. Схема виділення та очищення тиротрицину

- Повторна екстракція осаду в 30 мл етанолу (ніч).
- Центрифугування.
- Об'єднання супернатантів.
- Концентрування у вакуумі (при 50 °С).

4. Осадження та розчинення цільового продукту

- Внесення концентрату в 1% NaCl.
- Витримка 3 доби.
- Центрифугування.
- Декантація супернатанту.
- Розчинення осаду (тиротрицину) в етанолі.

5. Очищення на кислому оксиді алюмінію

- Приготування колонки з кислого оксиду алюмінію (1 см шар у 90% етанолі).
- Нанесення зразка.
- Елюювання 90% етанолу під тиском N₂.
- Вихід: 100% тироцидин, 97% грамїцидин; амінокислоти залишаються на колонці.

6. Контроль чистоти

- Додаткове фракціонування на Sephadex LH-20 (розчинник – диметилформаїд).
- Оцінка включення амінокислот: <0,05 нмоль/год/мг → недостатній вміст тироцидину.

РОЗДІЛ 9

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль є критично важливою частиною процесу культивування *B. brevis* для одержання тиротрицину, оскільки навіть незначне обсіменіння сторонньою мікрофлорою може спричинити зміни у метаболізмі продуцента, зниження біосинтетичної активності, а у випадку домінування контамінації — повне припинення виробництва цільового продукту (Красінько, Сулейко, Удимович, 2022).

Контроль стерильності поживного середовища здійснюється до моменту внесення інокуляту, аби підтвердити, що середовище не містить сторонньої мікрофлори після стерилізації. Здійснюється за наступною процедурою (Красінько, Сулейко, Удимович, 2022):

- Відбір проб проводять з ферментера або резервуарів із середовищем у стерильні пробірки чи флакони.
- Проби інокують у рідке (наприклад, глюкозо-пептонне) та щільне поживне середовище (наприклад, МПА) і інкубують при 30–37 °С протягом 5–7 діб.
- Спостерігають за наявністю каламутності, утворенням осаду, плівки або колоній на чашках Петрі.
- За відсутності зростання протягом усього періоду середовище вважається стерильним.

Цей контроль рекомендовано проводити для кожної партії середовища після автоклавування або стерилізації в ферментері.

Контроль чистоти культури спрямований на підтвердження того, що в процесі ферментації бере участь виключно *B. brevis*, без домішок інших мікроорганізмів. У виробничих умовах основним методом цього контролю є

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Костюк М.С.					64	71
Перевір.		Стабніков В.П.				<i>Кафедра БТМ</i>		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

мікроскопічне дослідження мазків (Красінько, Сулейко, Удимович, 2022).

Методика (Красінько, Сулейко, Удимович, 2022):

- Відбирається проба культури з ферментера або резервуара з інокулятом.
- Готується мазок на предметному склі.
- Застосовується фарбування для кращої видимості бактерій (можна метиленовим синім)
- Проводиться мікроскопія при збільшенні $\times 1000$ з імерсійною олією.

Очікується виявлення паличок характерної морфології, що утворюють ендоспори. Відсутність сторонніх морфотипів (грампозитивних або грамнегативних коків, гіф, дріжджів тощо) свідчить про чистоту культури.

Такий підхід є простим, швидким і економічним способом рутинного контролю в умовах виробництва, дозволяє вчасно виявити контамінацію та вжити заходів щодо усунення проблеми.

9.2. Показники росту і синтезу тиротрицину

9.2.1. Концентрація біомаси

Оцінка концентрації біомаси є ключовим аналітичним показником у процесі культивування *B. brevis* для одержання тиротрицину, оскільки вона безпосередньо відображає ефективність росту продуцента та дозволяє контролювати фазу розвитку, в якій синтез метаболіту є максимальним.

Для визначення концентрації біомаси передбачається спектрофотометричний аналіз. Для цього, відбирають пробу культуральної рідини в об'ємі 5 мл. Зразок наливають в кювету та ставлять в спектрофотометр та вимірюють оптичну густину на довжині хвилі OD600. Далі, одержаний результат порівнюють з калібрувальною кривою та визначають рівень біомаси (Sheng et al, 2020).

9.2.2. Концентрація тиротрицину

Концентрацію тиротрицину визначають спектрофотометрично, оскільки він містить тирозин та триптофан в своєму складі.

5 мл культури центрифугують протягом 10 хвилин при 4500 g та двічі промивають дистильованою водою. Після видалення супернатанту осад розчинили в 2 мл етанолу протягом 6 годин. Потім суспензію центрифугували; супернатант зберігали, а осад ресуспендували в 1 мл етанолу ще протягом 2 годин. Об'єднані спиртові розчини освітлювали, додаючи 0,5 г порошку кислого оксиду алюмінію. Оптичну густину при 280 нм використовували як міру утворення тиротрицину (Zhang, Jiang, Ren, Yang, & Guo, 2012).

9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Загальний вміст карбону (C) та азоту (N) у зразках визначали методом елементарного аналізу з використанням аналізатора Elementar Vario EL III, який працює за принципом високотемпературного окиснення та термокондуктометричного детектування (Silva-Castro et al, 2015).

Суть методу полягає в повному згорянні висушеного зразка при 950–1000 °C у струмені кисню, що призводить до утворення CO₂ і N₂ (або оксидів азоту). Газоподібні продукти транспортуються гелієм через систему очищення до детектора, де фіксується їх концентрація (Silva-Castro et al, 2015).

Для аналізу використовували надосадову фракцію культуральної рідини, отриману після центрифугування (9000 g, 10 хв). Аліквоту супернатанту (50–100 мкл) висушували до сталої маси при 60–70 °C, після чого подрібнювали та зважували 2–3 мг сухого зразка у капсулі. Для калібрування застосовували стандартні речовини з відомим вмістом C і N (Silva-Castro et al, 2015).

Кожен зразок аналізували щонайменше двічі. Після вимірювання програма автоматично розраховувала масову частку карбону та азоту з урахуванням навіски та калібрувальних коефіцієнтів. Перед запуском серії проводили автоматичне очищення колонок і перевірку сигналу (Silva-Castro et al, 2015).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Anderson, J., & Paterek, E. (2023). Tonsillitis. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544342/>

Bartley, I. M., Hodgson, B., Walker, J. S., & Holme, G. (1972). The use of acid alumina and sephadex LH-20 for the separation and characterization of ethanol-soluble peptides produced by bacillus brevis. *Biochemical Journal*, 127(3), 489-502.

Berditsch, M., Afonin, S., & Ulrich, A. S. (2007). The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6620-6628. <https://doi.org/10.1128/AEM.00881-07>

Biolab Diagnostics Laboratory Inc. (n.d.). TECHNICAL SHEET. <http://www.biolab.rs/wp-content/uploads/2018/01/Yeast-Extract.pdf>

Bolivar Torg. (2025, May 8). Бульйон яловичий сухий гранульований Halal CalNort 1000 г - Bolivar Torg. https://bolivartorg.com.ua/product/buljon-yalovychyj-halal-calnort-1000-g/?gad_source=1&gad_campaignid=22407874778&gbraid=0AAAAAp9h34cDT4adKNHskN0l80SRfJIKv&gclid=Cj0KCQjw9O_BBhCUARIsAHQMjS6cCC1gC8pIPaVtLA64id3YnCUav5NOJ3imn6ldpprmfNafHkNZBksaAjwZEALw_wcB

Celtone Complete Medium (13C, 98%; 15N, 98%) - Cambridge Isotope Laboratories, CGM-1040-CN-0.1. (n.d.). <https://isotope.com/cell-growth-media-and-protein-production/celtone-complete-medium-13c-15n-cgm-1040-cn-01>

Chimegee, N., & Dashmaa, D. (2018). The daily value of micronutrients in newly produced beef and horse concentrated bone broths. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 23(01), 30-34. <http://dx.doi.org/10.5564/mjas.v23i01.1018>

Essack, S., Bell, J., Burgoyne, D. S., Duerden, M., & Shephard, A. (2019). Topical (local) antibiotics for respiratory infections with sore throat: an antibiotic stewardship perspective. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 44(6), 829-837. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13012>

Industrial-scale fermenter 1000-5000L - Sysbiotech. (2018, December 14). Sysbiotech. <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-fermenter-1000-5000l/>

Kindheart. (2023, June 20). *Скільки людей в середньому хворіють на ангіну: статистика та фактори ризику*. Порадник Від Експертів. <https://kindheart.org.ua/zdorov-ya/skilki-lyudey-v-serednomu-khvoriyut-na-anginu-statistika-ta-faktori-riziku.html>

Lang, C., & Staiger, C. (2016). Tyrothricin—an underrated agent for the treatment of bacterial skin infections and superficial wounds?. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(6), 299-305. <https://doi.org/10.1691/ph.2016.6038>

Logan, N. A., & Vos, P. D. (2015). Bacillus. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-163. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>

Markitwired. (2024, June 24). Throat Sprays Market expected to grow steadily worldwide, with a 2.1% CAGR of US\$598.3 Million by 2033 | FMI. *PharmiWeb.com*. <https://www.pharmiweb.com/press-release/2024-06-24/throat-sprays-market-expected-to-grow-steadily-worldwide-with-a-21-cagr-of-us-5983-million-by-20>

Moreira, J. V., Silva, S. C. M., & Cremasco, M. A. (2020). Evaluation of carbon: nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth. *Biotechnology reports*, 26, e00440. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00440>

Nutrition facts for Soup, beef broth, bouillon, consomme, prepared with equal volume water, recommended daily values and analysis. (n.d.). NutrientOptimiser. <https://nutrientoptimiser.com/nutritional-value-soup-beef-broth-bouillon-consomme-prepared-with-equal-volume-water/>

Okuda, K., Edwards, G. C., & Winnick, T. (1963). Biosynthesis of gramicidin and tyrocidine in the Dubos strain of *Bacillus brevis* I: Experiments with Growing Cultures. *Journal of Bacteriology*, 85(2), 329-338. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.85.2.329-338.1963>

Özcengiz, G., & Ögülür, İ. (2015). Biochemistry, genetics and regulation of bacilysin biosynthesis and its significance more than an antibiotic. *New biotechnology*, 32(6), 612-619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.006>

Peptone from meat Granulated media 91079-38-8. (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/mm/107224?srsId=AfmBOoqB1PWsJDeHvM0pfhxgZGB8xERQIYgORYdGGzh5AJKq8oy7FH8w>

PubChem. (n.d.). *Tyrothricin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrothricin>

Public Domain Picture | Bacillus brevis. Gram stain. | ID: 13546609817284 | PublicDomainFiles.com. (n.d.). http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13546609817284

Razavi, B. M., & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). A review and new insights to antimicrobial action of local anesthetics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 991-1002. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-03460-4>

Robertson, A. (2023). *Understanding the risk of emerging bacterial resistance from the use of sore throat over-the-counter topical antibiotics* (Doctoral dissertation, Cardiff University).

Rodríguez, A. A., Otero-González, A., Ghattas, M., & Ständker, L. (2021). Discovery, optimization, and clinical application of natural antimicrobial peptides. *Biomedicines*, 9(10), 1381. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9101381>

Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. (2023, January). Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. In *Healthcare* (Vol. 11, No. 13, p. 1946). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>

Seddon, B., & Fynn, G. H. (1973). Energetics of growth in a tyrothricin-producing strain of *Bacillus brevis*. *Microbiology*, 74(2), 305-314. <https://doi.org/10.1099/00221287-74-2-305>

Sheng, M., Jia, H., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, T., Long, Y., ... & Liu, H. (2020). Siderophore production by rhizosphere biological control bacteria

Brevibacillus brevis GZDF3 of Pinellia ternata and its antifungal effects on Candida albicans. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 689. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10066>

Silva-Castro, G. A., Uad, I., Gonzalez-Martinez, A., Rivadeneyra, A., Gonzalez-Lopez, J., & Rivadeneyra, M. A. (2015). Bioprecipitation of calcium carbonate crystals by bacteria isolated from saline environments grown in culture media amended with seawater and real brine. *BioMed research international*, 2015(1), 816102. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/816102>

Stauss-Grabo, M., Atiye, S., Le, T., & Kretschmar, M. (2014). Decade-long use of the antimicrobial peptide combination tyrothricin does not pose a major risk of acquired resistance with gram-positive bacteria and Candida spp. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(11), 838-841. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25985581/>

Stauss-Grabo, M., Atiye, S., Le, T., & Kretschmar, M. (2014). Decade-long use of the antimicrobial peptide combination tyrothricin does not pose a major risk of acquired resistance with gram-positive bacteria and Candida spp. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(11), 838-841. <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2014.4686>

Tang, X. J., Thibault, P., & Boyd, R. K. (1992). Characterisation of the tyrocidine and gramicidin fractions of the tyrothricin complex from Bacillus brevis using liquid chromatography and mass spectrometry. *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 122, 153-179. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(92\)87015-7](https://doi.org/10.1016/0168-1176(92)87015-7)

Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., ... & Wang, T. (2022). Yeast extract: characteristics, production, applications and future perspectives. *Journal of microbiology and biotechnology*, 33(2), 151. <https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057>

Taxonomy. (n.d.). *Taxonomy browser (Brevibacillus brevis)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=1393>

Tyrothricin (CAS 1404-88-2). (n.d.). Cayman.

<https://www.caymanchem.com/product/22177/tyrothricin>

Vogt, T. B., Schinzel, S., & Bechinger, B. (2003). Biosynthesis of isotopically labeled gramicidins and tyrocidins by *Bacillus brevis*. *Journal of Biomolecular NMR*, 26, 1-11. <https://doi.org/10.1023/a:1023074911861>

Zhang, Y., Jiang, L., Ren, F., Yang, J., & Guo, H. (2012). Response surface methodology analysis to improve production of tyrothricin in *Bacillus brevis*. *African Journal of Biotechnology*, 11(47), 10744-10752.

<https://doi.org/10.5897/AJB2025.17730>

Жирій, К. (2025, April 25). Скільки людей проживають в Україні: МВФ оприлюднив оцінку чисельності населення. *УНІАН*.

<https://www.unian.ua/economics/other/naselennya-ukrajini-mvf-ociniv-skilki-lyudey-prozhivaye-v-krajini-12989370.html>

Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

Ланда, В., & Ревук, М. (2024, April 9). Три важливі демографічні показники. 2023-го народилося найменше дітей за останні 300 років.

<https://texty.org.ua/articles/112194/try-vazhlyvi-demohrafichni-pokaznyky-2023-ho-narodylosya-najmenshe-ditej-za-ostanni-300-rokiv/>

Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: методичні рекомендації до вивчення дисципліни, проведення практичних занять та виконання контрольної роботи для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр», спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. та заоч. форм навч. / уклад. В.О. Красінько, Т.Л. Сулейко, В.М. Удимович, К.: НУХТ, 2022. – 45 с.

Тонзиліт. (n.d.). <https://universum.clinic.ua/service/zagalni-napryamki/lor/farynhit/>