

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Факультет Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Біотехнології і мікробіології**

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

_____ Наталія ГРЕГІРЧАК _____

(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» __лютого__ 2026 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Віктор СТАБНІКОВ _____

(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» __лютого__ 2026 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія» _____
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Біосинтез граміцидину *Aneurinibacillus migulanus* _____

Виконала: здобувачка 5 курсу, групи 1

_____ КНЯЗЄВА Ярослава Олексіївна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник _____ КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна _____

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

_____ Кудрявець Є. В. _____
(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2026р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
Факультет Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології
Віктор СТАБНИКОВ
«01» грудня 2025 року

**З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Князевої Ярослави Олексіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез граміцидину *Aneurinibacillus migulanus*
керівник роботи Красінько В.О., к.т.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від «28» листопада 2025 року №957 КС

2. Строк подання здобувачем роботи: «30» січня 2026 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Aneurinibacillus migulanus*,
цільовий продукт: граміцидин

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва граміцидину – 1 аркуш формату А1,
Апаратурна схема виробництва граміцидину – 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» грудня 2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Вступ	01.12.2025-03.12.2025	
2	Характеристика грамцидину	03.12.2025-10.12.2025	
3	Обґрунтування вибору та характеристика <i>Aneurinibacillus migulanus</i>	10.12.2025-17.12.2025	
4	Техніко-економічне обґрунтування	17.12.2025-24.12.2025	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	24.12.2025-31.12.2025	
6	Специфікація обладнання	31.01.2025-07.01.2026	
7	Основні етапи виділення та очищення грамцидину	07.01.2026-14.01.2026	
8	Контроль виробництва грамцидину	14.01.2026-21.01.2026	
9	Виконання технологічної схеми проекту	21.01.2026-28.01.2026	
10	Виконання апаратурної схеми проекту	28.01.2026-30.01.2026	

Здобувач(ка)

(підпис)

Ярослава КНЯЗЄВА

(ім'я та прізвище)

Керівник

(підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО

(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification thesis is devoted to the development of technological and equipment flow diagrams for the biosynthesis of the antibiotic gramicidin using a modified strain *Aneurinibacillus migulanus*, which is characterized by a high productivity of the target product biosynthesis (2 g/L). Gramicidin is an antibiotic used for the topical treatment of infections of the external ear, throat, and dental root canals. The calculated production capacity is 24.84 kg (20.7 m³ of culture broth) of gramicidin per year.

The gramicidin biosynthesis technology includes a set of auxiliary operations (preparation of sterile aeration air, preparation of a 6% hydrochloric acid solution for medium acidification prior to sterilization, preparation and sterilization of a 6% sodium hydroxide solution for pH regulation before inoculum addition, preparation of an antifoam agent, and preparation and sterilization of nutrient media) and the main technological process (four stages of inoculum cultivation: in shake flasks, in seed fermenters with volumes of 5, 50, and 500 L, and industrial biosynthesis in a 5 m³ fermenter with a filling coefficient of 0.6).

Methods for monitoring pre-fermentation processes and industrial biosynthesis are described, as well as methods for determining the concentrations of biomass, the target product (gramicidin), carbon sources (glycerol), and nitrogen sources (ammonium oxalate) to optimize cultivation conditions.

The qualification thesis consists of an introduction, eight chapters, a list of references, a technological flow diagram, and an equipment diagram. The total volume of the thesis is 73 pages and includes 13 tables.

Keywords: gramicidin, *Aneurinibacillus migulanus*, industrial biosynthesis, isolation, throat infections, antibiotics.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу антибіотика граміцидину з використанням модифікованого штаму *Aneurinibacillus migulanus*, який характеризується високою продуктивністю біосинтезу цільового продукту (2 г/л). Граміцидин – це антибіотик, який застосовується для місцевого лікування інфекцій зовнішнього вуха, горла та кореневих каналів зубів. Розрахована потужність виробництва становить 24,84 кг (20,7 м³ культуральної рідини) граміцидину на рік.

Технологія біосинтезу граміцидину передбачає комплекс допоміжних робіт (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти для підкислення середовища для його стерилізації, приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для регуляції рН перед додаванням інокуляту, підготовка піногасника та приготування і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 5, 50 та 500 л та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Описано методики контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу, а також методи визначення концентрації біомаси, цільового продукту (граміцидину), джерел Карбону (гліцерину) і Нітрогену (оксалату амонію) для оптимізації умов культивування.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, восьми розділів, списку використаної літератури, технологічної схеми та апаратурної схеми. Загальний обсяг роботи – 73 сторінки, містить 13 таблиць.

Ключові слова: граміцидин, *Aneurinibacillus migulanus*, виробничий біосинтез, виділення, інфекції горла, антибіотики.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГРАМІЦИДИНУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА <i>ANEURINIBACILLUS MIGULANUS</i>	11
2.1 Обґрунтування вибору <i>Aneurinibacillus migulanus</i> та поживного середовища для його культивування	11
2.2 Розрахунок складу поживного середовища	18
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Aneurinibacillus migulanus</i>	20
2.4 Таксономічний статус біологічного агента	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ	22
3.1 Потреба населення України в граміцидині	22
3.2 Розрахунок потужності виробництва граміцидину	23
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу граміцидину	24
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу граміцидину культивуванням <i>Aneurinibacillus migulanus</i>	25
РОЗДІЛ 4. ОБґРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ .	27
4.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	27
4.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	29
4.3 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	30
4.3.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках	33
4.3.2 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	35
4.3.3 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого процесу у ферментері об'ємом 5 м ³	39
4.4 Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції pH у процесі біосинтезу граміцидину	40
4.5 Обґрунтування вибору піногасника	41
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	43
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	45
РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГРАМІЦИДИНУ	56
7.1 Виділення біомаси після завершення біосинтезу <i>A. migulanus</i>	56
7.2 Виділення граміцидину з клітинної біомаси	58
7.3 Очищення екстракту та кристалізація граміцидину	59
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ГРАМІЦИДИНУ	62
8.1 Мікробіологічний контроль	62
8.1.1 Висів на агаризовані поживні середовища	63
8.2 Показники росту і синтезу граміцидину	64
8.2.1 Визначення концентрації біомаси	64
8.2.2 Визначення концентрації граміцидину	65
8.2.3 Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену	67
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	69

ВСТУП

Інфекційно-запальні захворювання верхніх дихальних шляхів, зокрема тонзиліт, фарингіт та ларингіт, залишаються одними з найпоширеніших патологій в оториноларингології. Вони належать до найчастіших причин звернення за медичною допомогою, особливо у дитячому віці. Висока поширеність цих захворювань, їх рецидивна природа та можливі ускладнення зумовлюють високу медичну значущість проблеми. [1]

В Україні спостерігаються стабільно високі показники захворюваності на тонзиліт, фарингіт та ларингіт, при цьому близько 50% випадків припадає на дітей віком від 5 до 15 років. [2] Значна частина випадків має бактеріальне походження, серед яких основними збудниками є грампозитивні бактерії, зокрема представники родів *Streptococcus* та *Staphylococcus*. З огляду на загострення проблеми резистентності до поширених антибіотиків та побічні ефекти від системного прийому антибактеріальних засобів, особливої **актуальності** набувають препарати місцевої дії.

Антибіотики місцевої дії, зокрема граміцидин, широко використовують для лікування зазначених захворювань. Його перевагою серед інших засобів є низький ризик розвитку резистентності, оскільки при місцевому застосуванні препарат майже не потрапляє у системний кровотік та не чинить системного впливу на організм. Граміцидин належить до пептидних антибіотиків і проявляє високу активність щодо грампозитивних бактерій. Це зумовлює його ефективність при інфекційно-запальних захворюваннях верхніх дихальних шляхів. [3]

На фармацевтичному ринку представленні лікарські засоби, що містять граміцидин, зокрема таблетки для розсмоктування «Грамидин». Проте у зв'язку із запровадженням санкцій щодо виробників цього препарату та відсутністю вітчизняного виробництва лікарських засобів на основі граміцидину, актуальним є питання задоволення потреби населення України шляхом організації його виробництва.

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ			
					ВСТУП	Літ.	Ар.	Аркушів
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Князева Я.О.					7	73
Консульт.								
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Промислове отримання граміцидину здійснюється мікробіологічним шляхом із використанням наступних штамів-продуцентів: *Aneurinibacillus migulanus*, *A. migulanus* DSM 5759, *A. aneurinilyticus* CECT 9939. Проте саме штам *A. migulanus* демонструє найкращі технологічні переваги: культивується на економічно вигідному поживному середовищі і синтезує найвищу концентрацію цільового продукту (2 г/л) у короткі терміни (48 год). Це робить даний штам перспективним для промислового використання. [4]

Метою кваліфікаційної роботи є розроблення технологічного рішення для промислового отримання граміцидину методом культивування штаму *A. migulanus*, включаючи стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.

Новизна кваліфікаційної роботи полягає в обґрунтуванні та розробленні технологічної схеми вітчизняного виробництва граміцидину із застосуванням штаму *A. migulanus*, який характеризується здатністю синтезувати цільовий продукт з високою концентрацією – 2 г/л [4] та розрахунку параметрів обладнання для реалізації процесу в умовах промислового масштабу.

РОЗДІЛ 1. Характеристика граміцидину

Продуктом біосинтезу *Aneurinibacillus migulanus* є граміцидин.

Фізико-хімічні властивості. Граміцидин виглядає як білий порошок з жовтим відтінком. Брутто формула граміцидину: $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$ (рис. 1.1), молярна маса: 1141 г/моль. Було визначено дві характерні температурні області для граміцидину. При температурі 41-47°C відбувається розкладання олігомерних форм цієї сполуки. За температури $57 \pm 2^\circ\text{C}$, відбуваються зміни у водневих зв'язках β -шарів молекули, що супроводжуються руйнуванням міжпептидних водневих зв'язків і збереженням внутрішньопептидних зв'язків у складі менших олігомерів. Температура кипіння для граміцидину С не визначається, оскільки сполука є термічно нестійкою і розкладається за підвищених температур. [5]

Молекула граміцидину С характеризується поглинанням ультрафіолетового випромінювання, зумовленим наявністю пептидних зв'язків та ароматичних амінокислотних залишків. [6]

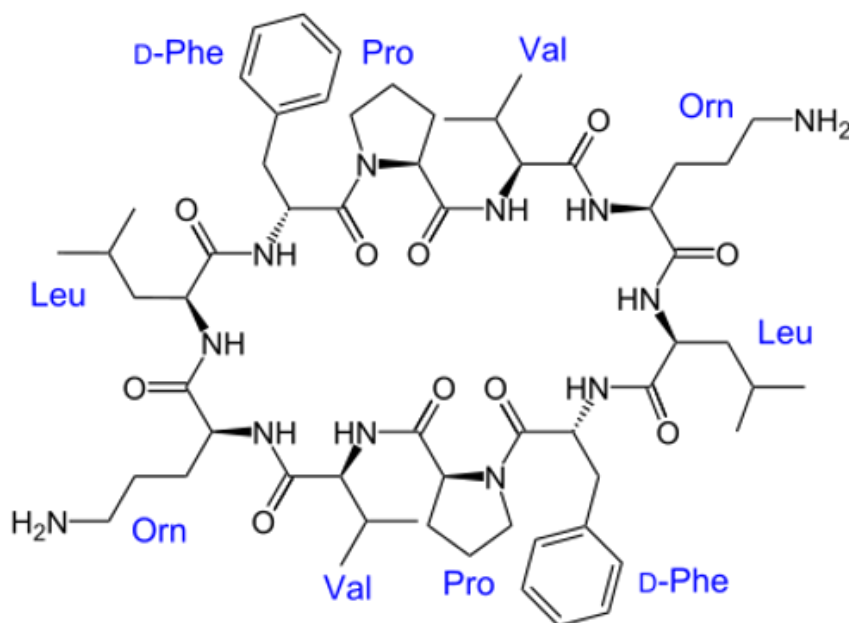


Рис 1.1 Молекулярна формула граміцидину С

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ				
Змн	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГРАМІЦИДИНУ		Літ.	Арк.	
Розроб.	Князева Я.О.							9	
Консульт.							Кафедра БТМ		
Керівник	Красінько В.О.								
Н. контр.									
Зав. каф.	Стабніков В.П.								

Граміцидин практично нерозчинний у воді і при контакті з водою утворює колоїдні суспензії, але він розчиняється в метанолі, етанолі, ацетоні, формальдегіді, ліпідах. [4]

Граміцидин С – це циклічний декапептид, який складається з двох ідентичних пентапептидних фрагментів: L-лейцин-D-фенілаланін-L-пролін-L-валін-L-орнітин.

Завдяки основним залишкам орнітину, граміцидин С здатний утворювати комплекси з іонами металів. Амфифільний характер граміцидину С зумовлений наявністю гідрофільних залишків орнітину та гідрофобної пептидної частини молекули. Саме така будова забезпечує ефективну взаємодію антибіотика з ліпідними мембранами бактеріальних клітин.

Інша важлива особливість граміцидину С є антипаралельна структура β -шару при розчиненні сполуки, або здатність утворювати її при наявності біліпідних шарів. [3]

Механізм біологічної дії. Граміцидин є ефективним як проти грам-позитивних, так і проти грам-негативних бактерій, вірусів, грибів, а також деяких одноклітинних патогенних еукаріотів. [7]

Основним механізмом дії граміцидину є його мембранолітична активність, яка полягає у порушенні структури цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів і викликає їх загибель. Через те, що даний антибіотик має неспецифічну дію, окрім бактеріостатичної та бактерицидної дії, він також виявляє гемолітичну дію і при потраплянні в кров, граміцидин руйнує клітини еритроцитів. Через це граміцидин використовується виключно локально, не вводиться парентерально і не використовується для системної терапії. [8]

Разом з тим, дія граміцидину не обмежується лише руйнуванням клітинних мембран. Показано, що він здатний інгібувати мембранні ферменти, такі як НАДФ-дегідрогеназу і термінальну оксидазу цитохромного типу bd.

Таким чином, граміцидин має комплексну дію, яка поєднує мембранолітичний ефект з порушенням ключових внутрішньоклітинних процесів. [9]

Сфери застосування. Вперше граміцидин С був виділений у 1942р. з *Bacillus brevis*. У зв'язку з його вираженою цитотоксичною дією антибіотик застосовується виключно для місцевого лікування. Граміцидин входить до складу комбінованих лікарських засобів для лікування інфекцій ЛОР-органів, шкіри та очей.

Грамідин міститься у таблетках для розсмоктування Грамідин, які використовують при інфекційно-запальних захворюваннях порожнини рота і горла, таких як: гострий фарингіт, ангіна, пародонтит, тонзиліт, гінгівіт та стоматит. [10]

Також міститься у краплях для очей і вух Софрадекс, які призначають при поверхневих бактеріальних інфекцій очей, блефариті, інфікованій екземі повік; алергічному кон'юнктивіті; кератиті rosacea; склериті та епісклериті. Також використовується при зовнішньому отиті. [11]

Грамідин також входить до складу крему Dermasombin, разом з іншими діючими речовинами (неоміцин, тріамцинілон ацетонід та ністатин). Даний препарат призначають при шкірних захворюваннях, чутливих до кортикостероїдів та ускладнених інфекцією. [12]

Враховуючи широкий спектр антимікробної дії граміцидину С, відсутність сформованої бактеріальної резистентності та обмеження щодо системного застосування, розроблення нових та удосконалення біотехнологічних схем його отримання є актуальним питанням сучасної біотехнології. [8]

Біотехнологічний спосіб отримання граміцидину має переваги порівняно з хімічним синтезом насамперед через складну циклічну пептидну будову молекули. Хімічний синтез граміцидину є багатостадійним і недоцільним на практиці. При біотехнологічному підході з використанням *A. niger* антибіотик утворюється у біологічно активній формі і потребує менше енергетичних витрат, що є більш придатним для промислового застосування.

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика *Aneurinibacillus migulanus*

2.1 Обґрунтування вибору *Aneurinibacillus migulanus* та поживного середовища для його культивування

Для синтезу грамїцидину зазвичай використовують штами *Aneurinibacillus migulanus* NCTC 7096, *A. migulanus* Nagano та ін. Однак у результаті подальших досліджень було відібрано штами з вищими показниками синтезу антибіотика, які наведені в табл. 2.1. У цій таблиці наведено порівняльну характеристику продуцентів грамїцидину: *A. migulanus*, *A. migulanus* DSM 5759 та *A. aneurinilyticus* CECT 9939. Час культивування для усіх трьох штамів є однаковим, проте склад поживних середовищ та концентрація синтезованого грамїцидину суттєво відрізняються.

Тому для вибору оптимального штаму біологічного агента було поведено розрахунок вартості поживного середовища для культивування кожного з обраних продуцентів (табл. 2.2).

Аналіз даних, наведених у табл. 2.2, показує що середовище для культивування *A. migulanus* є найдешевшим серед розглянутих варіантів. Для остаточного підтвердження доцільності його вибору, розрахуємо умовну вартість біосинтезу 1 г грамїцидину (табл. 2.3). Отримані результати свідчать, що умовна вартість грамїцидину, синтезованого *A. migulanus* є найнижчою (4,57грн), тоді як швидкість його утворення – найвищою (0,0417г/год).

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБґРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ANEURINIBACILLUS MIGULANUS	Лім.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Князева Я.О.					12	73
Консульт.						Кафедра БТМ		
Керівник		Красінко В.О.						
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Порівняння особливостей одержання грамїцидину культивуванням *Aneurinibacillus migulanus*

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація грамїцидину	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	Концентрація г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	Гліцерин Молочна кислота K ₂ HPO ₄ NaCl MgSO ₄ * 7H ₂ O Оксалат амонію Дріжджовий автолізат Казеїн гідролізат	37,8 9,84 2 5 0,2 12 До 0,1 До 0,2	48	2 ± 0.3 г/л	Культивування в колбах на качалці, рН після стерилізації = 7,02-7,2; рівень аерації 1,25 м ³ O ₂ /м ³ на годину, тиск Р=0,5 АТМ; інтенсивність перемішування повинна забезпечувати масообмін кисню від 0,2-0,3 ммоль O ₂ /л•хв на початку бродіння до 0,4-1,0 ммоль O ₂ /л•хв в кінці	За вихідними даними, які були надані керівником

					бродіння, залежності біомаси	в від
<i>Aneurinibacillus migulanus</i> DSM 5759	Гліцерин L-аргінін L-феніланін L-метіонін L-гістидин K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgCl ₂ *6H ₂ O CaCl ₂ *2H ₂ O MnCl ₂ *4H ₂ O FeCl ₃ *6H ₂ O	10 10 1 0,5 1,3 6,5 1,7 0,2 0,1 0,01 0,0002	48	1,356 ± 0,156 г/л	Культивування в колбах об'ємом 350мл з 40мл ПС, яке інокулювали клітинами з минулої нічної культури, або 3-5 денних колоній. Об'єми інокуляції визначали шляхом вимірювання оптичної густини при 660 нм (OD660) та доводили до 105 КУО/мл. Ферментація проходила при температурі 40°C, яка є оптимальною для <i>A. migulanus</i> .	Bereditsch M., Afonin S., Steineker A., Orel N. et al. Fermentation and Cost-Effective ¹³ C/ ¹⁵ N Labeling of the Nonribosomal Peptide Gramicidin S for Nuclear Magnetic Resonance Structure Analysis. Applied and Environmental Microbiology. 2015; 81(11): 3593–3603. doi: 10.1128/aem.00229-15. [9]
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> CECT 9939	Триптон-соевий агар: Триптон Гідролізат сої NaCl K ₂ HPO ₄ Глюкоза	17 3 5 2,5 2,5	48	1,167 ± 0,28 г/л	Культивування в колбі на качалці об'ємом 250мл з 100мл середовища, ліофілізований інокулянт був введений у середовище. t = 37°, n = 150 об/хв.	Lvova K., Vecino X., Perez-Cid et al. Efficient one step extraction process of Gramicidin S from <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> biomass. Front. Bioeng. Biotechnol. 2024; 12(1452796). doi: 10.3389/fbioe.2024.1452796[13]

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів граміцидину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	Гліцерин	37,8	39	1,4742	1
	Молочна кислота	9,84	106	1,04304	2
	K ₂ HPO ₄	2	43,2	0,0864	2
	NaCl	5	3	0,015	1
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2	40	0,008	2
	Оксалат амонію	12	85	1,02	3
	Дріжджовий автолізат	До 0,1	703	0,0703	2
	Казеїн гідролізат	До 0,2	1200	0,24	2

	Поліпропілен гліколь	2	120	0,24	3
	Вартість 1л середовища – 9,12664 грн				
<i>Aneurinibacillus migulanus</i> DSM 5759	Гліцерин	10	39	0.39	1
	L-аргінін	10	750	7.5	3
	L-феніланін	1	1500	1,5	4
	L-метіонін	0,5	950	0,475	2
	L-гістидин	1,3	2680	3,484	2
	K ₂ HPO ₄	6,5	43,2	0,2808	2
	KH ₂ PO ₄	1,7	200	0,34	3
	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2	75	0,015	2
	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,1	50	0,005	2
	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,01	238	0,00238	2
	FeCl ₃ *6H ₂ O	0,0002	350	0,00007	2
	Вартість 1л середовища – 13,99225 грн				
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> CECT 9939	Триптон	17	1188	20,196	1
	Гідролізат сої	3	906	2,718	2
	NaCl	5	3	0,015	1
	K ₂ HPO ₄	2,5	43,2	0,108	2

	Глюкоза	2,5	120	0,3	3
	Вартість 1л середовища – 23,337 грн				

Примітка. * Ціни наведено станом на січень 2026р.: 1 – <https://flagma.ua> 2 – <https://prom.ua>

3 - <https://www.covalent.com.ua> 4 - <https://uhtrade.com.ua>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г граміцидину, синтезованому культивуванням *Aneurinibacillus migulanus*

Біологічний агент	Концентрація граміцидину, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного граміцидину за год, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г граміцидину, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	2	48	0,0417	9,13	4,57
<i>Aneurinibacillus migulanus</i> DSM 5759	1,356	48	0,0283	13,99	10,32
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> CECT 9939	1,167	48	0,2431	23,34	20

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Згідно з літературними даними, при культивуванні *Aneurinibacillus migulanus* концентрація граміцидину в культуральній рідині становить близько 2 г/л, а концентрація біомаси – 0,2г/л (табл. 2.1). Тривалість культивування – 48 год. [4]

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу граміцидину:

Граміцидин є пептидним антибіотиком, тому основна частина Карбону витрачається на синтез біомаси та пептидної молекули. Як джерело вуглецю для синтезу граміцидину до поживного середовища додають гліцерин, який є триатомним спиртом і легко засвоюється мікроорганізмами.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 100г граміцидину. Брутто формула граміцидину: $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$. Його молекулярна маса становить 1141. Тобто, у 1141г граміцидину міститься 720,6 г Карбону, а в 2 г граміцидину $(720,6 \cdot 2) / 1141 = 1,26$ г Карбону.

Далі, розрахуємо у скількох грамах гліцерину міститься 1,26 г Карбону, враховуючи що вміст Карбону в гліцерині становить 39%. Отже, у 100г гліцерину міститься 39 г Карбону, а 1,26 г Карбону міститься у $(1,26 \cdot 100) / 39 = 3,23$ г гліцерину. Тобто, поживне середовище повинне мати 3,23г/л гліцерину, або 0,323% (масова частка). Якщо врахувати, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах 40% від субстрату окиснюється до вуглецевого газу для отримання енергії, то для метаболізму вміст гліцерину в середовищі повинен бути $(3,23 \cdot 40) / 100 + 3,23 = 4,5$ г/л = 0,45%

Потреби для синтезу біомаси:

Прийнято, що вміст вуглецю в біомасі становить близько 50%, тоді в 0,2 г біомаси міститься $0,2 \cdot 50 / 100 = 0,1$ г Карбону. Стільки Карбону міститься у $0,2 \cdot 100 / 39 = 0,5$ г вуглеводів гліцерину.

З урахуванням того, що близько 40% субстрату використовується клітиною для енергетичного обміну та окиснюється до CO_2 , в поживне середовище потрібно внести $(0,5 \cdot 40) / 100 + 0,5 = 0,7$ г гліцерину щоб отримати 0,2г біомаси.

Загальна кількість гліцерину, потрібна для синтезу цільового продукту та біомаси становить $4,5г + 0,7 г = 5,2$ г/л = 0,52%.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу граміцидину:

Для одержання граміцидину у промисловості як джерело Нітрогену використовується оксалат амонію, тому розрахуємо вміст $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ у середовищі для одержання 2 г/л цільового продукту.

Молекулярна маса граміцидину становить 1141. У 1141г граміцидину відповідно до брутто-формули міститься 168 г Нітрогену (N), тобто у 2 г граміцидину міститься $(2 \cdot 168) / 1141 = 0,294$ г Нітрогену.

Далі розраховуємо в якій кількості оксалату амонію міститься така кількість Нітрогену: у 124 г оксалату амонію міститься 28г Нітрогену, тоді 0,294 г Нітрогену буде міститися у $(124 \cdot 0,294) / 28 = 1,3$ г солі.

Щоб отримати 2 г/л граміцидину потрібно внести 1,3 г оксалату амонію.

Потреби для синтезу біомаси:

Припустимо, біомаса на 10% складається з Нітрогену. Отже, у 0,2 г біомаси вміст азоту становить 0,02 г.

Розраховуємо скільки оксалату амонію потрібно внести в поживне середовище для отримання 0,2 г/л біомаси. Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ становить 124 г, 28 г з яких припадає на Нітроген. Тоді, 0,02 г азоту міститься у $(124 \cdot 0,02) / 28 = 0,089$ г солі.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

Фосфор входить до складу нуклеїнових кислот, АТФ та фосфоліпідів клітинної мембрани. У біомасі зазвичай міститься 3% Фосфору (за елементом P). Тоді, для синтезу 0,2 г/л біомаси поживне середовище повинне мати $(0,2 \cdot 3) / 100 = 0,006$ г. Джерелом Фосфору при біосинтезі граміцидину використовується K_2HPO_4 .

Вміст Фосфору у K_2HPO_4 становить $31 / 174 = 18\%$. Отже, необхідна кількість K_2HPO_4 в середовищі становить $174 \cdot 0,006 / 31 = 0,033$ г. За таких умов кількість Фосфору, що вноситься у середовище є достатньою для росту продуцента.

Слід зазначити, що у поживних середовищах концентрація фосфатів може бути вищою, оскільки їх солі також виконують буферну функцію та забезпечують стабільність рН у процесі культивування.

Інші компоненти середовища

Джерелами мікро- та макроелементів, які є необхідними для росту бактерій, є компоненти, які додаються до поживного середовища у малих кількостях. Джерелом

Магнію є $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, джерелом Натрію та Хлору – NaCl , а джерелом необхідних амінокислот (таких як лейцин, ізолейцин, глютамін, метіонін, триптофан) і ростових факторів є дріжджовий автолізат та казеїн гідролізат.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Aneurinibacillus migulanus*

Клітини штаму *Aneurinibacillus migulanus* є грампозитивними паличкоподібними бактеріями розміром 4-8 мкм в довжину і 0,6-0,7 мкм у ширину. Вони утворюють ендоспори овальної форми розміром 0,8-1,0 мкм, що характерно для представників роду *Aneurinibacillus*.

При культивуванні штаму на агарі Гаузе-Бражнікової, протягом 48 годин при температурі 40°C утворюються круглі колонії, що виступають над поверхнею агару. Вони мають чіткий кратероподібний або точкоподібний центр, бежеві за забарвленням, непрозорі і мають пастоподібну консистенцію. Легко знімаються з поверхні середовища бактеріальною петлею.

Форма та розміри колоній залежать від складу поживного середовища, щільності засіву та умов культивування. Під час культивування можливі дисоціація культури на варіанти з різною морфологією, що знижує вихідний рівень синтезу грамїцидину. [4]

За літературними даними описане існування деяких фенотипових видів колоній, які відрізняються за розмірами та рельєфом поверхні, причому визначено, що найефективнішими продуцентами грамїцидину є шорсткі, щільні бежеві колонії діаметром 5-7 мм. [7]

Бактерія є облігатним аеробом, що зумовлює необхідність постійної аерації під час культивування. Температурний оптимум для культивування становить 40°C, що зумовлює необхідність дотримання асептичних умов культивування для запобігання контамінації середовища. Також *A. migulanus* є нейтрофільним по відношенню до рН і синтезує грамїцидин при значенні 7,02-7,2.

Бактерія не розріджує желатин і не гідролізує крохмаль. Як джерела азоту мікроорганізм використовує амінні і амонійні форми, що було враховано при виборі складу поживного середовища. [4]

Граміцидин, який продукується штамом *A. migulanus*, належить до вторинних метаболітів і синтезується у пізній експоненційній і стаціонарній фазах росту культури, що визначає необхідність періодичного режиму культивування.

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Перший штам продуцента граміцидину був виділений з ґрунту у 1942 році і на той момент був описаний як *Bacillus brevis* var. G.V. Наступні декілька десятиліть цей штам перебував у декількох міжнародних колекціях культур, включно з NCTC (Лондон, Великобританія), ATCC (Манассас, США), DSMZ (Німеччина), у зв'язку з цим, назва штамів змінювалась залежно від колекції.

На основі поліфазних таксономічних досліджень 35 штамів *B. brevis*, штам ATCC 9999 був визначений як типовий штам і виділений у новий вид: *B. migulanus* sp. nov. Далі, у 1996 році, використовуючи дані аналізу послідовностей 16S рРНК, цей штам був рекласифікований як *Aneurinibacillus migulanus* comb. nov. ДНК-ДНК гібридизація далі показала, що штами *B. brevis* DSM 5668 і DSM 5759 також належать до виду *A. migulanus*. [7]

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба населення України в граміцидині

У зв'язку зі зростанням поширеності захворювань верхніх дихальних шляхів, зокрема фарингітів та тонзилітів, які супроводжуються болем у горлі, зростає потреба у виробництві місцевих протимікробних препаратів. Використання системних антибіотиків у таких випадках вважається недоцільним, адже вони сприяють виникненню резистентності і небажаних побічних ефектів. Тому перевага надається антибіотикам локальної дії, які не викликають звикання і діють безпосередньо на причину інфекції.

Одним із таких препаратів є Граммідин, діючою речовиною якого є граміцидин. Цей препарат випускається у формі пастилок і використовується для лікування інфекцій ротової порожнини та горла. [10]

За даними Центру громадського здоров'я МОЗ України, протягом епідемічного сезону 2024 – 2025 рр. було зареєстровано понад 4,6 млн випадків ГРВІ. [14] Приблизно 30% хворих мають симптоми ураження горла, що становить 1,38 млн випадків щорічно. Припускається, що 20-30% пацієнтів застосовують ліки місцевої дії, які містять граміцидин, що орієнтовно складає 276 – 414 тис. пацієнтів на рік.

Якщо розрахувати дозу препарату на одного пацієнта, можна знайти приблизне значення щорічного споживання граміцидину в Україні. Згідно з інструкцією, спосіб застосування Граммідину для дорослих та дітей старше 12 років становить 2 таблетки 4 рази на добу. Дітям молодше 12 років слід приймати 1-2 пастилки 4 рази на добу. Для розрахунку візьмемо максимальні дози. Курс лікування зазвичай становить 5 днів. [10]

Таким чином, знаючи середню кількість пацієнтів та рекомендовану дозу препарату, можна оцінити річну потребу України у граміцидині, потрібну для виготовлення даних пастилок.

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ			
					РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Князева Я.О.						
Консульт.								
Керівник		Красінко В.О.						
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						
					Літ.		Арк.	Аркушів
							23	73
					Кафедра БТМ			

Розрахунок кількості потрібного грамїцидину

Група пацієнтів	Кількість таблеток на добу	Вміст грамїцидину в дозі препарату на добу, мг	Тривалість прийому, діб	Кількість грамїцидину на 1 людину, мг	Кількість хворих в Україні на рік, тис. осіб	Загальна кількість грамїцидину на всіх хворих, кг
Дорослі та діти від 3 років	8	12 (8 таб * 1,5 мг)	5	60 = 0,06 г	414	24,84

Примітка. Для розрахунку взято до уваги, що пацієнти обирають препарат Граммідин, який містить 1,5 мг грамїцидину у одній пастильці. Також для спрощення розрахунків, було використано найбільше значення частки пацієнтів, які застосовують препарати на основі грамїцидину - 30%, тобто 414 тис. осіб.

Отже, згідно з таблицею, потреба в грамїцидині для лікування ГРВІ з ураженням горла становить 24,84 кг.

3.2. Розрахунок потужності виробництва грамїцидину

В Україні відсутнє власне виробництво грамїцидину і усі потреби забезпечуються імпортованими препаратами. Враховуючи ризики, пов'язані з обмеженням імпорту та санкціями проти основних постачальників, доцільним є створення повністю локалізованого виробництва грамїцидину. Отже, вироблятимемо наступну кількість грамїцидину: 24,84 кг.

Розрахувавши загальну потребу у грамїцидині на рік, можливо визначити кількість культуральної рідини, необхідної для виготовлення 24,84 кг антибіотика. Враховуючи що *Aneurinibacillus migulanus* синтезує 2 г/л грамїцидину за 48 год, отримаємо такі результати:

$$2 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$24,84 \text{ кг} - X$$

$$X = (24,84 * 1) / 2 = 12,42 \text{ м}^3$$

Втрати цільового продукту при виділенні становлять 40%, тому розрахуємо загальну кількість культуральної рідини, потрібної для синтезу граміцидину ($V_{\text{кр}}$):

$$12,42 - 60\%$$

$$V_{\text{кр}} - 100\%$$

$$V_{\text{кр}} = (12,42 * 100) / 60 = 20,7 \text{ м}^3$$

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

Для задоволення річної потреби у граміцидині потрібно синтезувати $20,7 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Далі розрахуємо скільки потрібно часу на проведення підготовчих операцій:

- Для ферментера:
 - Миття та огляд апарату – 1,5 год
 - Перевірка на герметичність – 1 год
 - Підігрів апарату – 0,5 год
 - Стерилізація апарату – 1 год
 - Охолодження апарату – 1 год
 - Завантаження середовища - 2 год
 - Засів – 0,5 год
 - Вивантаження культуральної рідини – 1 год

Отже, загальний час проведення підготовчих операцій для ферментера становить 8,5 год, тоді $T_{\text{пр}} = 8,5$ год.

Цикл роботи ферментера розраховується за наступною формулою, враховуючи що тривалість культивування $T_{\text{к}} = 48$ год:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{к}} + T_{\text{пр}} = 48 \text{ год} + 8,5 \text{ год} = 56,5 \text{ год}$$

Припустимо, що кількість робочих днів на рік ($T_{\text{рд}} = 30$ діб і біосинтез граміцидину буде відбуватися сезонно, 1 місяць на рік у піковий сезон захворюваності. Знаючи це, можна розрахувати об'єм культуральної рідини за цикл:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_{\text{кр}} * T_{\text{цф}}) / (T_{\text{рд}} * 24) = (1,5 * 20,7 * 56,5) / (30 * 24) = 2,44 \text{ м}^3$$

Де K_1 - коефіцієнт запасу, який враховує витрати цільового продукту від нестерильних операцій (1,1 – 1,5). Для розрахунків прийнято максимальне значення ($K_1 = 1,5$), з метою компенсації можливих втрат.

Геометричний об'єм ферментера обчислюємо, знаючи коефіцієнт заповнення ($k_S = 0,6$):

$$V_{ГФ} = V_{ЦК} / k_S = 2,44 / 0,6 = 4,06 \text{ м}^3 \cong 5 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{ГФ} = 5 \text{ м}^3$. Тоді, габаритні розміри ферментера складуть 1900 мм в діаметрі і висотою у 4700 мм.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу грамїцидину культивуванням *Aneurinibacillus migulanus*

Виробничий біосинтез грамїцидину здійснюється у ферментері об'ємом $V_{ГФ} = 5 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення $k_S = 0,6$.

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{РОБ} = V_{ГФ} * k_S = 5 * 0,6 = 3$$

Так як кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища, для одержання 3 м^3 (3000 л) культуральної рідини, потрібна наступна кількість посівного матеріалу:

$$V_{РОБ1} = 3000 * 0,1 = 300 \text{ л}$$

Для одержання такої кількості посівного матеріалу, потрібен посівний апарат з наступним об'ємом:

$$V_{ПА1} = V_{РОБ1} / k_S = 300 / 0,6 = 30 \text{ л}$$

Для засіву такого апарату, потрібно мати наступну кількість посівного матеріалу:

$$V_{РОБ2} = 30 * 0,1 = 3 \text{ л}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють у інокуляторі з наступним об'ємом:

$$V_{ПА2} = V_{РОБ2} / k_S = 3 / 0,6 = 5 \text{ л}$$

Для отримання 3 л культуральної рідини, потрібно мати:

$$V_{РОБ3} = 3 * 0,1 = 0,3 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту отримують культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовуються 2 колби об'ємом 500 мл, які містять 150 мл середовища у кожній.

Таблиця 3.2 зображає висновки щодо кількості стадій підготовки поживного середовища і об'ємів ферментаційного обладнання.

Таблиця 3.2

Об'єм ферментера, м³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера (об'єм середовища), м³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м³	Конденсат (10%), м³
5	0,6	3	0,3 (300л)	0,3 (300л)
0,5 (500л)	0,6	0,3 (300л)	0,03 (30л)	0,03(30л)
0,05 (50л)	0,6	0,03 (30л)	0,003 (3л)	0,003 (3л)
0,005 (5л)	0,6	0,003 (3л)	0,0003 (0,3л)	0,0003(0,3л)

Отже, процес одержання посівного матеріалу для біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м³ буде проходити у 5 етапів.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оскільки оптимальною температурою для культивування аеробного штаму *Aneurinibacillus migulanus* є 40°C, а оптимальне значення рН середовища перебуває в межах 7,02 – 7,2, процес біосинтезу здійснюється в асептичних умовах з метою запобігання контамінації сторонніми мікроорганізмами. [4] За таких значень температури та рН ризик появи та розвитку контамінантів є високим, тому необхідно стерилізувати обладнання, що контактує з середовищем, а також повітря для аерації, поживне середовище і піногасник.

Асептичні умови найкраще підтримуються під час глибинного культивування, яке дозволяє проводити процес у герметичних апаратах із контрольованими параметрами температури, рН, аерації та перемішування. Крім того, такий спосіб культивування є найбільш технологічно доцільним для аеробних мікроорганізмів і використовується у промисловому виробництві антибіотиків.

Для культивування штаму *A. migulanus* доцільно використовувати періодичний спосіб культивування, адже граміцидин належить до вторинних метаболітів і його синтез розпочинається переважно у стаціонарній фазі росту культури. Безперервне культивування є недоцільним, адже культура підтримується в фазі експоненційного росту, що перешкоджає накопичуванню цільового продукту.

Вибір типу ферментера визначається фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, а також вимогами процесу біосинтезу. З огляду на аеробний характер *A. migulanus* та його потребу у постійному надходженні розчиненого кисню, ферментер повинен бути оснащений системою аерації. Подача аераційного повітря здійснюється через барботер після проходження індивідуального повітряного фільтра, що забезпечує його стерильність.

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ			
					РОЗДІЛ 4. ОБґРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Князева Я.О.						
Консульт.								
Керівник		Красінко В.О.						
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						
					Літ.		Арк.	Аркуші
							28	73
					Кафедра БТМ			

Процес культивування проводиться під надлишковим тиском (близько 0,5 атм), тому розчинність кисню у культуральній рідині підвищується. Для підтримання стабільного тиску в ферментері застосовується система автоматичного контролю: подача повітря регулюється редуктором, а тиск контролюється відповідним датчиком і контролером.

Для рівномірного розподілу кисню в культуральній рідині ферментер обладнується перемішувальним пристроєм. Перемішування, аерація та підвищений тиск забезпечують необхідний рівень насичення киснем поживного середовища під час біосинтезу.

Підтримання оптимальної температури культивування (40°C) забезпечується за допомогою встановленої сорочки та автоматичної системи контролю температури. Вирощування продуцента супроводжується тепловиділенням, зумовленим інтенсивним метаболізмом клітин. Перегрівання культуральної рідини призводить до втрат біомаси та зниження інтенсивності біосинтезу грамідцину. Для підтримання сталої оптимальної температури й запобігання перегріванню здійснюється подача охолодженої оборотної води у змішувачі-теплообмінники та секційну сорочку ферментера.

Наявність дріжджового автолізу та гідролізу казеїну підсилює ймовірність піноутворення під час культивування. У зв'язку з цим ферментер доцільно оснастити механічним піногасником на рівні піноутворення. За необхідності можливе додавання хімічного піногасника, зокрема «Struktol J 647» (поліпропіленгліколь) у мінімальних концентраціях, адже надлишковий вміст піногасників може знизити масообмін кисню в білковмісних середовищах.

Для контролю кислотності середовища ферментер обладнується рН-зондом із можливістю автоматичного регулювання значення рН за допомогою додавання відповідних титрувальних розчинів (15% розчини хлоридної кислоти та натрій гідроксиду).

Таким чином, ферментер обов'язково повинен бути обладнаний датчиками температури (для підтримання 40°C), датчиком концентрації розчиненого кисню, зондом рН (7,02 – 7,2), а також датчиком рівня піноутворення, які автоматизують проведення контролю за процесом біосинтезу.

Отже, для культивування штаму *A. migulanus* у ферментері об'ємом 5 м³ і коефіцієнтом заповнення 0,6, обираємо ферментер від Sysbiotech, який обладнаний мішалкою, барботером, сорочкою, піногасниками та системами контролю. За потреби, дана фірма може забезпечити ферментер додатковими функціями, або надати консультації щодо виготовлення обладнання під замовлення.

4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Aneurinibacillus migulanus є облігатним аеробом, тому для його росту та для синтезу грамїцидину необхідна постійна подача кисню. За умови нерівномірної або недостатньої аерації метаболізм клітин знижується і, відповідно, інтенсивність біосинтезу антибіотика зменшується або припиняється.

Потрапляння сторонньої мікрофлори з повітрям порушує стерильність, що у свою чергу може призвести до пригнічення росту продуцента, припинення синтезу грамїцидину і втрати культури. Щоб уникнути цього, повітря, що подається, повинне бути стерильним.

Оскільки багатостадійна підготовка аераційного повітря повинна забезпечити киснем великі об'єми культуральної рідини, цей процес доцільно здійснювати централізовано в окремих приміщеннях. Під час даного процесу із зібраного повітря видаляються механічні домішки, волога та мікроорганізми перед його подачею у ферментер.

Повітря готується у декілька стадій, які наведені і описані нижче:

- Збирають повітря за допомогою спеціальної вертикальної труби, яка розміщена на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі. Труба повинна бути обладнана забірником і очисником повітря;
- Далі повітря очищується від пилу, розмір частинок якого становить більше 50 мкм, за допомогою плоских тканинних фільтрів грубого очищення;
- Повітря нагрівається до температури 120-200 °С і стискається у компресорі або турбоповітродувці;
- Далі стиснене повітря охолоджується до температури «точки роси», при якій конденсується волога;

- Повітря подається у ресивер, де видаляється конденсована волога та пари мастила з компресора. Також ресивер зменшує пульсації руху повітря, які негативно впливають на роботу подальших фільтрів;
- Показники тиску і температури стабілізуються підігріванням повітря паром у теплообмінниках до температури 45-50 °C;
- З теплообмінників аераційне повітря подається у головні ємнісні набивні фільтри, які очищують до ступеня $E=95\%$ і розміщені поблизу ферментаційних відділень.
- З головних фільтрів за допомогою колекторів повітря подається до індивідуальних фільтрів, які встановлені на ферментері. Ступінь очищення такого повітря становить $E=99,99\%$.

Відпрацьоване повітря очищується та знешкоджується на головних фільтрах, які встановлені безпосередньо на ферментері.

4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно розрахункам, біосинтез граміцидину відбувається у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 і містить 3 м³ поживного середовища. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири стадії: в колбах на качалці і посівних апаратах об'ємом 5 л, 50 л і 500 л.

Результати розрахунку кількості стадій та об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу для біосинтезу грамїцидину *A. migulanus*

Об'єм ферментера, м³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м³	Конденсат (10%), м³	Об'єм підготовки поживного середовища, м³
5	0,6	3	0,3	0,3	2,4
0,5	0,6	0,3	0,03(30 дм ³)	0,03	0,24
0,05 (50 дм ³)	0,6	0,03 (30 дм ³)	0,003 (3 дм ³)	0,003	0,024
0,005 (5 дм ³)	0,6	0,003 (3 дм ³)	0,0003 (0,3 дм ³)	*	0,003

* - Конденсат не розраховано, адже стерилізація компонентів поживного середовища відбувається у колбах в автоклаві.

При культивуванні *A. migulanus* для отримання грамїцидину, буде використовуватися середовище такого складу (г/л):

- гліцерин – 37,8
- молочна кислота (40%) - 27,52
- K₂HPO₄ - 2
- NaCl - 5
- MgSO₄ * 7H₂O - 0,2
- оксалат амонію - 12

- дріжджовий автолізат - до 0,1
- гідролізат казеїну - до 0,2 [4]

Для вирощування посівного матеріалу будемо використовувати середовище з наступним складом (г/л):

- дріжджовий автолізат - 0,005
- молочна кислота (40%) - 3,39
- гліцерин - 25,2
- NaCl - 5
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2
- оксалат амонію - 8,12
- K_2HPO_4 - 9,9 [4]

Стерилізації підлягають усі компоненти, окрім гліцерину, який використовується у вигляді технічного продукту і вноситься в поживне середовище окремо після стерилізації усіх інших компонентів, оскільки концентрований гліцерин знижує активність води – один з ключових факторів обмеження розвитку мікроорганізмів – це зменшує ризик контамінації при асептичному перекачуванні з герметичної ємності.

Для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, оскільки об'єм невеликий (300 мл), стерилізацію поживного середовища будемо проводити в автоклаві. При використуванні інокуляторів і ферментера, стерилізацію можна здійснювати безпосередньо у них при значенні рН 4,0–4,5 для запобігання утворення нерозчинних солей фосфатів магнію. Для того, щоб підкислити середовище до такого значення, готується 6% розчин хлоридної кислоти (до концентрованої кислоти додається вода). Після стерилізації рН середовища регулюється до 7,02-7,2 за допомогою стерильного 6%-го розчину NaOH.

У табл. 4.2 наведені необхідні об'єми розчинів HCl та NaOH для приготування поживного середовища на кожній стадії виробництва.

Розрахунок вмісту та особливості приготування розчинів кислоти та лугу для всіх стадій процесу

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,3	—	—	—	—
3	6	У колбі на 25 мл	6	У колбі на 25 мл
30	60	У колбі на 100 мл	60	У колбі на 100 мл
300	600	У колбі на 1 л	600	У колбі на 1 л
3000	6 л	У реакторі на 10 л	6 л	У реакторі на 10 л

4.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Через різницю в режимах стерилізації компонентів поживного середовища, а також ризик утворення нерозчинних солей, розділимо їх на композиції.

Композиція А: дріжджовий автолізат, молочна кислота. Режим стерилізації – 112°C протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl, MgSO₄ * 7H₂O, оксалат амонію. Режим стерилізації – 131°C протягом 40 хв.

Композиція В: K₂HPO₄. Режим стерилізації – 131°C протягом 40 хв.

Стерилізація компонентів першої стадії біосинтезу буде проходити в автоклаві, адже об'єми невеликі. Всі композиції змішуються в асептичних умовах після охолодження. Через те, що компоненти композиції А є термолабільними, вони будуть стерилізуватися при м'якому режимі. Щоб уникнути утворення нерозчинних солей, композиція В має фосфати, які не варто стерилізувати разом з солями магнію, які містяться у композиції Б.

У таблиці 4.3 наведений розрахунок вмісту компонентів поживних середовищ для вирощування інокуляту в колбах.

Таблиця 4.3

Розрахунок композиції стерилізації компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 300 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
дріжджовий автолізат	0,005	0,0015*	А	0,1
молочна кислота (40%)	3,39	1,017		
вода		100 мл		
NaCl	5	1,5	Б	0,175
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2	0,06		
оксалат амонію	8,12	2,44		

вода		175 мл		
K ₂ HPO ₄	9,9	2,97	В	0,025
вода		25 мл		
Усього				0,3

*Через те, що зважити 1,5 мг дріжджового автолізату неможливо, готується у 100 разів більш концентрований розчин і після розчинення, відбирається 1 мл розчину, який додається до композиції А.

4.3.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л

На цій стадії потрібно 3 л поживного середовища, а об'єм води для його підготовки становить 2,8 л. Стерилізація середовища буде проходити у двох колбах об'ємом 2 л.

Композиція А: дріжджовий автолізат, молочна кислота. Режим стерилізації – 112°C протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl, MgSO₄ * 7H₂O, K₂HPO₄, оксалат амонію. Режим стерилізації – 131°C протягом 40 хв, рН середовища 4,0–4,5.

Композиція А та Композиція Б стерилізуються в колбах в автоклаві адже об'єми невеликі. Розподіл на композиції відбувається через різницю в режимах стерилізації. Композиції додаються до посівного апарату об'ємом 5 л після стерилізації.

У таблиці 4.4 наведена кількість компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л.

Таблиця 4.4

Розрахунок композиції стерилізації компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
дріжджовий автолізат	0,005	0,015	А	1,5
молочна кислота (40%)	3,39	10,17		
вода		1,4		
NaCl	5	15	Б	1,5
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2	0,6		
K ₂ HPO ₄	9,9	29,7		
оксалат амонію	8,12	24,36		
вода		1,4		
Усього				3

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л

Для цієї стадії потрібно 30 л поживного середовища, для приготування композицій якого необхідно 29 л води. Приготування середовища проходить у реакторі об'ємом 50 л, що обладнаний датчиком рН.

Композиція А: дріжджовий автолізат, молочна кислота. Режим стерилізації – 112°C протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl, MgSO₄ * 7H₂O, K₂HPO₄, оксалат амонію. Режим стерилізації – 131°C протягом 40 хв, рН середовища 4,0–4,5.

Композицію А стерилізують в автоклаві при більш м'яких умовах, а Композицію Б стерилізують у реакторі-змішувачі.

Розрахунок необхідних компонентів і їх кількості для приготування поживного середовища в посівному апараті об'ємом 50 л, наведений у таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Розрахунок композиції стерилізації компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 30 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
дріжджовий автолізат	0,005	0,15	А	1,5
молочна кислота (40%)	3,39	101,7		
вода		1 л		
NaCl	5	150	Б	28,5
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2	6		
K ₂ HPO ₄	9,9	297		
оксалат амонію	8,12	243,6		
вода		28 л		
Усього				30

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 500 л

Для цієї стадії потрібно 300 л поживного середовища, для приготування композицій якого необхідно 291 л води. Приготування середовища проходить у реакторі-змішувачі об'ємом 500 л.

Композиція А: дріжджовий автолізат, молочна кислота. Режим стерилізації – 112°C протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl, MgSO₄ * 7H₂O, K₂HPO₄, оксалат амонію. Режим стерилізації – 131°C протягом 40 хв, рН середовища 4,0–4,5.

Композиція А готується і стерилізується у колбі об'ємом 6 л, а Композиція Б готується у реакторі-змішувачі і стерилізується при звичайній для солей температурі в інокуляторі.

У таблиці 4.6 показаний склад та необхідна кількість компонентів для приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л.

Таблиця 4.6

Розрахунок композиції стерилізації компонентів поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 500 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 30 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
дріжджовий автолізат	0,005	1,5	А	6
молочна кислота (40%)	3,39	1017		
вода		3 л		
NaCl	5	1500	Б	294

MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2	60		
K ₂ HPO ₄	9,9	2970		
оксалат амонію	8,12	2436		
вода		288 л		
Усього				300

4.3.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого процесу у ферментері об'ємом 5 м³

Для біосинтезу граміцидину необхідно 3 м³ поживного середовища. Поживне середовище поділяється на композиції і стерилізується окремо, враховуючи термолабільність кожного з компонентів. Компоненти Композиції А стерилізуються при м'якіших умовах в інокуляторі об'ємом 150 л. Композиція Б готується у реакторі об'ємом 5 м³.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів поживного середовища для виробничого біосинтезу граміцидину у ферментері об'ємом 5 м³ наведений у таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Розрахунок композиції стерилізації компонентів поживного середовища для виробничого біосинтезу граміцидину в ферментері об'ємом 5 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3000 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
---------------------------------------	-------------------	---	-------------------	-------------------------------

дріжджовий автолізат	0,1	0,3	А	150
гідролізат казеїну	0,2	0,6		
молочна кислота (40%)	27,52	78,3 (73,8 л)		
вода		40 л		
NaCl	5	15	Б	2850
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2	0,6		
K ₂ HPO ₄	2	6		
оксалат амонію	12	36		
вода		2830 л		
Усього				3000

4.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу граміцидину

Оптимальним значенням рН поживного середовища під час біосинтезу граміцидину є 7,02–7,2. Оскільки навіть невеликі відхилення від оптимуму можуть негативно вплинути на кількість синтезованого антибіотику, важливою є постійна підтримка цього значення. Склад поживного середовища зумовлює можливі коливання рН, адже воно містить амонійну сіль і органічні компоненти. Це обґрунтовує необхідність забезпечення автоматичного регулювання кислотності середовища із застосуванням титрувальних розчинів хлоридної кислоти та натрій гідроксиду.

Розчин амоній гідроксиду не використовується для підлуження середовища, адже він впливає на С/Н співвідношення і не підходить для процесу біосинтезу граміцидину як вторинного метаболіту.

15%-й розчин хлоридної кислоти готується у реакторі об'ємом 25 л для підкислення культуральної рідини у процесі культивування. Розчин не стерилізується: в асептичних умовах до концентрованої кислоти додається стерильна вода. Також готується 15%-й розчин гідроксиду натрію в аналогічному реакторі. Розчин лугу стерилізується перед додаванням до поживного середовища.

4.5 Обґрунтування вибору піногасника

Через наявність у середовищі білкових компонентів, а також інтенсивну аерацію, можливе піноутворення. Згідно патенту, є необхідним використання хімічного піногасника (поліпропілен гліколь). Піногасник підлягає обов'язковій стерилізації перед його додаванням до середовища у реакторі об'ємом 10 л. [4]

* * *

Отже, технологічна схема біосинтезу граміцидину має наступні додаткові стадії:

- 1) Підготовка аераційного повітря та його очищення після відпрацювання;
- 2) Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при його стерилізації в інокуляторах об'ємом 5 л, 50 л, 500 л і ферментері об'ємом 5 м³;
- 3) Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для нейтралізації середовища перед культивуванням в інокуляторах об'ємом 5 л, 50 л, 500 л і ферментері об'ємом 5 м³;
- 4) Приготування титрувальних розчинів (15%-й розчин хлоридної кислоти та 15%-й розчин гідроксиду натрію) для підтримки рН під час біосинтезу граміцидину у ферментері об'ємом 5 м³;
- 5) Приготування та стерилізація піногасника.

Також необхідно передбачити наступне обладнання:

- В цеху підготовки посівного матеріалу:
 - Реактор об'ємом 6 л для приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти для підкислення середовища перед стерилізацією ПС в інокуляторі об'ємом 500 л

- Реактор об'ємом 6 л для приготування 6%-го розчину гідроксиду натрію для нейтралізації середовища в інокуляторі об'ємом 500 л
- Реактор об'ємом 10 л для стерилізації піногасника
- Реактори-змішувачі об'ємами 50 л і 500 л для розчинення і стерилізації солей композиції Б для приготування поживного середовища відповідних об'ємів 50 л і 500 л.
- В цеху виробничого біосинтезу:
 - Реактор об'ємом 15 л для приготування 15%-го титрувального розчину хлоридної кислоти;
 - Реактор об'ємом 15 л для приготування 15%-го титрувального розчину гідроксиду натрію;
 - Реактор-змішувач об'ємом 150 л для приготування композиції А;
 - Реактор-змішувач об'ємом 5 м³ для розчинення і стерилізації солей композиції Б.

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
I-1	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 5 л GAOK 51 Bioreactor. Матеріал: нержавіюча сталь SUS316L (кришка та основа) та боросилікатне скло (ємність). Оснащений датчиком рН, температури, піни та перемішуючим пристроєм. Робочий тиск 0,10 МПа. Габаритні розміри: 800х600х650мм [15].
P-2	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л. Матеріал: Нержавіюча сталь марки 304 (рама), боросилікатне скло GG-17 (ємність). Оснащений сорочкою та мішалкою 0-600 об./хв, потужність двигуна мішалки – 120 Вт. Габаритні розміри: 600х600х2000мм [16].
H-3	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос B-FCD 0601 230V (ETATRON D.S.). Максимальна потужність: 5 Вт; продуктивність: 6 л/год, максимальний робочий тиск: 1 бар [17].
I-4	Інокулятор	1	Інокулятор Lab1st BR500-M1-50L об'ємом 50 л з нержавіючої сталі, містить сорочку, фільтр повітря, мішалку, датчики температури, рН, рО ₂ , піни; габаритні розміри: 1000х928х1790мм [18].
P-5	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор Yalian об'ємом 500 л. Матеріал: нержавіюча сталь 316L/304. Потужність перемішувача: 0,75-55 кВт. Оснащений мішалкою (0-3500 об/хв), сорочкою, датчиками температури і швидкості мішалки. Габаритні розміри: 1000х900х2200мм [19].
H-6	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос ALP Low Pressure Tube Pump ALP17 (Albin Pump). Максимальна потужність: 0,28 кВт; продуктивність: 910 л/год; максимальний робочий тиск: 4 бар [20].
I-7	Інокулятор	1	Інокулятор Lab1st BR500Pro-C1 500L об'ємом 500 л з нержавіючої сталі оснащений сорочкою, фільтром повітря, мішалкою (швидкість 50-1000 об/хв), датчиками температури, рН, рО ₂ , піни [21].

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Князева Я.О.					44	73
Консульт.								
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

P-8	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач Lab1st JSR-B Series об'ємом 150 л. Матеріал: нержавіюча сталь. Потужність перемішувача: 120 Вт; швидкість перемішування: 0-600 об/хв. Оснащений лопатевою мішалкою, сорочкою та температурним датчиком. Габаритні розміри, мм: 1000x1250x2350 [22].
P-9	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Реактор-змішувач Sysbiotech об'ємом 5000 л. Матеріал: нержавіюча сталь 316L для частин, що контактують з середовищем; 304 для частин що не контактують. Швидкість перемішування: 10-600 об/хв (до 1000 об/хв на замовлення). Оснащений мішалкою, сорочкою, датчиком температури, рН, рО ₂ , пробовідбірником; максимальний тиск: 3 бар. [23]
H-10	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий САМ 200 ("Speroni"). Потужність: 1,5 кВт; матеріал робочого колеса: чавун; висота напору: 9 м; продуктивність: 6 м ³ /год.[24]
P-11	Реактор-змішувач для приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти та гідроксиду натрію	2	Реактор JSR-10 («YNCHEM») об'ємом 10 л. Оснащений сорочкою, датчиком температури і тиску, мішалкою (80 - 460 об/хв). Максимальна температура: 200 °C [25].
P-12	Реактор-змішувач для приготування титрувального 15%-го розчину хлоридної кислоти та гідроксиду натрію	2	Реактор JSR-30 («YNCHEM») об'ємом 30 л. Оснащений сорочкою, датчиком температури і тиску, мішалкою (80 - 460 об/хв). Максимальна температура: 200 °C [25].
P-13	Реактор для стерилізації піногасника	1	Реактор JSR-10 («YNCHEM») об'ємом 10 л. Оснащений сорочкою, датчиком температури і тиску, мішалкою (80 - 460 об/хв). Максимальна температура: 200 °C [25].
ФР-14	Ферментер	1	Ферментер Sysbiotech об'ємом 5000 л (Австрія). Матеріал: нержавіюча сталь 316L; оснащений сорочкою, мішалкою, барботером, датчиком температури, рН, рО ₂ , піни, пробовідбірником, турбінною мішалкою (10-600 об/хв); максимальний тиск: 3 бар [23].
H-15	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос відцентровий САМ 200 ("Speroni"). Потужність: 1,5 кВт; матеріал робочого колеса: чавун; висота напору: 9 м; продуктивність: 6 м ³ /год.[24]

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми

В даному розділі наведений опис кожної стадії процесу біосинтезу граміцидину з використанням *Aneurinibacillus migulanus*. Стадії поділяються на допоміжні роботи (ДР), які виконують перед початком основного технологічного процесу (ТП). До допоміжних робіт належать: підготовка аераційного повітря, приготування 6%-го розчину кислоти і лугу (HCl і NaOH), приготування титрувального розчину (15%) кислоти і лугу для підтримання рН, стерилізація піногасника та підготовка поживних середовищ і підготовка посівного матеріалу. До технологічного процесу належить виробничий біосинтез у ферментері.

Технологічну та апаратурну схеми наведено у графічній частині курсового проекту.

ДР 1 Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Повітря забирають за допомогою спеціальної вертикальної труби, яка розміщена на висоті 2–3 м від найвищої точки будівлі.

ДР 1.2 Очищення повітря від грубих часток і пилу

Забране повітря (з ДР 1.1) очищується від пилу, розмір частинок якого становить більше 50 мкм, за допомогою плоских тканинних фільтрів грубого очищення.

ДР 1.3 Нагрівання та стиснення повітря

Грубо очищене повітря (з ДР 1.2) нагрівається до температури 120-200°C і стискається у компресорі до 0,35–0,5 МПа. Стиснення повітря підвищує вологість на одиницю його об'єму.

Стиснене повітря (з ДР 1.3) подається у теплообмінник і охолоджується до температури «точки роси», при якій конденсується волога, після чого повітря подається у ресивер, де видаляється конденсована волога та пари мастила з компресора. Також ресивер зменшує пульсації руху повітря, які негативно впливають на роботу подальших фільтрів.

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ				
					РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ				
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Князева Я.О.							
Консульт.									
Керівник		Красінько В.О.							
Н. Контр.									
Зав. каф.		Стабніков В.П.							
					Лім. Арк. Аркушів				
					46 73				
					Кафедра БТМ				

ДР 1.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

ДР 1.5 Нагрівання повітря

Охолоджене повітря (з ДР 1.4) подається у теплообмінник, де воно нагрівається паром низького тиску до температури 45-50 °C і стабілізуються показники тиску і температури.

ДР 1.6 Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (з ДР 1.5) подається у головні ємнісні набивні фільтри, які розміщені поблизу ферментаційних відділень і очищують до ступеня E=95%.

ДР 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Очищене повітря (з ДР 1.6) подається до індивідуальних фільтрів, які встановлені безпосередньо на ферментері. Ступінь очищення такого повітря становить E=99,99%.

ДР 2 Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації

ДР 2.1 Приготування 6% розчину HCl об'ємом 6 мл в колбі

Розчин готується у трьох різних колбах для різних етапів біосинтезу граміцидину. Для першої стадії вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 5 л, потрібна колба на 25 мл з 5,16 мл стерильної води, до якої додається приблизно 0,84 мл концентрованої хлоридної кислоти. Маніпуляції проводять в асептичних умовах.

ДР 2.2 Приготування 6% розчину HCl об'ємом 60 мл в колбі

Для наступного посівного апарату об'ємом 50 л, беремо колбу на 100 мл яка містить 51,6 мл води і додаємо 8,4 мл 37%-го розчину хлоридної кислоти в асептичних умовах.

ДР 2.3 Приготування 6% розчину HCl об'ємом 600 мл в колбі

На кінець для підкислення середовища біосинтезу граміцидину в посівному апараті об'ємом 500 л, у колбу на 1 л з 516 мл стерильної води, дотримуючись асептики, додають концентровану хлоридну кислоту і ретельно перемішують.

ДР 2.4 Приготування 6% розчину об'ємом 6 л HCl в реакторі

Для приготування розчину до стерильної води, яка знаходиться у реакторі в асептичних умовах, додають 842 мл 37%-го розчину хлоридної кислоти і доводять решту водою до об'єму 6 л.

ДР 3 Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужування середовища перед культивуванням

ДР 3.1 Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH об'ємом 6 мл в колбі

Готують колбу об'ємом 25 мл. На технічних вагах зважують наважку натрій гідроксиду вагою 0,38 г, додають у колбу і, дотримуючись технік безпеки роботи з агресивними лугами, заливають водою до потрібного об'єму (6 мл).

Потім колбу закривають марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв. Після охолодження розчин можна використовувати для нейтралізації рН перед додаванням інокуляту.

ДР 3.2 Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH об'ємом 60 мл в колбі

На технічних терезах зважують наважку натрій гідроксиду вагою 3,82 г. У колбу об'ємом 100 мл додають наважку і доливають питною водою до об'єму розчину 60 мл. Далі колба закривається марлевим корком і стерилізується в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР 3.3 Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH об'ємом 600 мл в колбі

На технічних вагах вимірюють 38,16 г гідроксиду натрію і додають наважку до колби об'ємом 1 л. Поступово додають питну воду до повного розчинення NaOH і об'єму розчину 600 мл.

Колбу закривають марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР 3.4 Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH в реакторі

В реактор додається близько 5 л питної води температури 30°C і при перемішуванні, повільно додають 385 г гранул гідроксиду натрію. Після їх розчинення об'єм доводиться водою до 6 л.

Потім суміш стерилізується за температури 131°C протягом 40 хв усередині реактору.

ДР 4 Приготування титрувальних розчинів для підтримки рН під час культивування

ДР 4.1 Приготування 15%-го розчину HCl

Для підкислення середовища під час культивування штаму, приготуємо 15%-й розчин хлоридної кислоти. Орієнтовно приготуємо 15 л розчину і будемо використовувати його за потреби за допомогою ручного або автоматичного дозування.

Для приготування розчину, у простерилізований 25-літровий реактор заливаємо насосом 8 л дистильованої води. Далі поступово додаємо 6 кг 37%-ї хлоридної кислоти,

постійно помішуючи. Після додавання усього об'єму кислоти, доводимо об'єм розчину водою до 15 л.

ДР 4.2 Приготування і стерилізація 15%-го розчину NaOH

Аналогічно до ДР 3.1, готуємо 15 л 15%-го розчину натрій гідроксиду для підлучення середовища під час культивування штаму. Для цього готуємо реактор об'ємом 25 л, додаємо 12 л питної води, вмикаємо мішалку і, дотримуючись правил безпеки, повільно додаємо 2,25 кг твердого натрій гідроксиду. Після повного розчинення лугу доводимо об'єм розчину до 15 л водою.

Кришка реактора герметично закривається, і розчин стерилізується при температурі 131°C протягом 40 хвилин.

ДР 5 Підготовка піногасника

До реактору об'ємом 10л додають 6 л поліпропілен гліколю. Кришку закривають герметично і стерилізують піногасник за допомогою електричного тону при температурі 121°C протягом 20 хв під тиском 1,1 атм.

ДР 6 Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 6.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту в колбах на качалках потрібно підготувати 300 мл поживного середовища. Після стерилізації та охолодження усіх композицій, композиції А і В додаються у колбу з композицією Б, дотримуючись правил асептики.

ДР 6.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

Через те, що зважити 1,5 мг дріжджового автолізату неможливо, готується у 100 разів більш концентрований розчин: до 10 мл води додається 15 мг автолізату, попередньо зваженого на торсійних вагах. Після розчинення, відбирається 1 мл розчину, який додається до колби об'ємом 200 мл, яка містить 100 мл води.

Далі на технічних вагах зважують 1 г молочної кислоти. Наважку додають у колбу, яку закривають марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112°C протягом 30 хв.

ДР 6.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,5 г хлориду натрію і 2,4 г оксалат амонію. Також на торсійних терезах зважують 6 мг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу на 1 л,

яка містить 150 мл води і стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131°C.

ДР 6.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 2,97 г K_2HPO_4 і додають наважку до колби об'ємом 50 мл, яка містить 25 мл води. Композицію стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131°C.

ДР 6.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л

Для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л, потрібно приготувати 3 л поживного середовища. Стерилізація середовища буде проходити у двох колбах об'ємом 2 л.

ДР 6.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На торсійних вагах зважують 15 мг дріжджового автолізу, а на технічних вагах вимірюють 10,1 г молочної кислоти. Додають наважки до колби на 2 л і доливають водою до об'єму розчину 1,5 л. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хв.

ДР 6.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

Використовуючи технічні терези, зважуємо 15 г натрій хлориду, 0,6 г семиводного магній сульфату, 29,7 г гідрофосфату калію і 24,4 г амоній оксалату. Додають наважки до колби на 2 л і додають 1,35 л питної води. Використовуючи магнітний перемішувач, розчиняють усі компоненти. Далі додають 6 мл 6%-го розчину хлоридної кислоти (з ДР 2.1) до рН 4 – 4,5. Закривають колбу ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131°C.

ДР 6.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л

Приготування середовища проходить у реакторі об'ємом 50 л, що обладнаний датчиком рН. Потрібно приготувати 30 л поживного середовища, враховуючи коефіцієнт заповнення і об'єм інокуляту з попередньої стадії інокуляції. Конденсат на даному етапі становить 3 л.

ДР 6.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування цієї композиції, на технічних вагах зважують 2,7 г дріжджового автолізу і додають його у воду температури 30°C у колбі об'ємом 1,5 л, повільно помішуючи. Далі після розчинення, додають 96 мл 40%-го розчину молочної кислоти і 243 г оксалат амонію у колбу, перемішують, закривають марлевою пробкою і стерилізують цей розчин в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хв.

ДР 6.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

Цю композицію готують у змішувачі-реакторі об'ємом 50 л. До нього додають 20,7 л води і додають наважки, зміряні на технічних вагах, наступних речовин: 150 г натрій хлориду, 6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 297 г K_2HPO_4 і 243 г оксалат амонію. Також додають 60 мл розведеної хлоридної кислоти (з ДР 2.2) для підкислення середовища і включають перемішувач у реакторі. Закривають кришку реактора і стерилізують розчин при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР 6.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 500 л

Приготування поживного середовища проходить у реакторі об'ємом 500 л з коефіцієнтом заповнення 0,6, після чого воно переноситься у інокулятор такого ж об'єму. При розрахунку на те, що об'єм інокуляту становить 30 л, потрібно приготувати 300 л поживного середовища.

ДР 6.4.1 Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування цієї композиції, на технічних вагах зважують 1,5 г дріжджового автолізу. Додають наважку у колбу об'ємом 100 мл, яка містить 50 мл води. Суміш нагрівають до 30°C і розмішують до повного розчинення автолізу. Далі суміш додають у колбу об'ємом 6 л, яка містить 3 л води і додають 1017 г молочної кислоти (приблизно 960 мл 40%-го розчину). Далі суміш перемішують до розчинення компонентів, колбу герметично закривають марлевым корком і стерилізують цю композицію в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хв.

ДР 6.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б

Цю композицію готують у змішувачі-реакторі об'ємом 500 л. До нього додають 282 л води і додають наважки, наступних речовин: 1,5 кг натрій хлориду, 60 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,97 кг K_2HPO_4 і 2,44 кг оксалат амонію. Також додають 600 мл розведеної 6%

хлоридної кислоти (з ДР 2.3) і включають перемішувач у реакторі. Закривають кришку реактора і стерилізують розчин при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР 6.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 5 м³

Так як робочий об'єм ферментеру становить 3 м³, готується поживне середовище об'ємом 3 м³. Композиція А стерилізується в реакторі-змішувачі об'ємом 150 л, а композиція Б змішується і стерилізується у ферментері об'ємом 5 м³.

ДР 6.5.1 Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування цієї композиції, на технічних вагах зважують 300 г дріжджового автолізу і 600 г гідролізату казеїну. Наважки вносять у 3-літрову колбу, що містить 1,5 л води. Суміш нагрівають до 30°C, при постійному перемішуванні до повного розчинення білкових компонентів.

Паралельно у реакторі об'ємом 150 л готують 40 л води. Включають мішалку і поступово додають 78,3 кг 40% розчину молочної кислоти.

Після розведення кислоти, з колби обережно додають розчинені білки. Потім герметично закривають кришку реактора і стерилізують цю композицію при температурі 112°C протягом 30 хв.

ДР 6.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б

Цю композицію готують у реакторі об'ємом 5 м³. До апарата вносять 2830 л води і вмикають мішалку. Через об'ємно-ваговий дозатор зважують і додають до реактору такі компоненти: 15 кг натрію хлориду, і 6 кг дигідрофосфату калію (K_2HPO_4) і 36 кг оксалат амонію.

Окремо, на технічних вагах зважують 540 г семиводного сульфату магнію ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), після чого додають його в апарат. Після повного розчинення компонентів, додають 6 л 6%-го розчину хлоридної кислоти (з ДР 2.4), який був попередньо приготовлений у відповідному реакторі.

Після додавання усіх компонентів композиції, апарат герметично закривають і здійснюють стерилізацію при температурі 131°C протягом 40 хв.

ТП 7 Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1 Підтримання колекційної культури

Бактеріальна суспензія культури *Aneurinibacillus migulanus* зберігається у 15% захисному розчині гліцерину при температурі від -20 °С до -80 °С.

ТП 7.2 Одержання робочої культури на щільному середовищі

Готується середовище Гаузе-Бражнікова (дріжджова вода 50% по об'єму, пептон 1%, натрію хлорид 0,5%, агар-агар 3%). Наливається у чашки Петрі і охолоджується до застигання. Штам колекційної культури висівають методом виснажувального штриха. Одержані колонії культивують у термостаті при температурі 40°C протягом 2-3 діб.

ТП 7.3 Вирощування культури на щільному середовищі

У пробірки з середовищем Гаузе-Бражнікова висівають культури, отримані з попереднього культивування у чашках Петрі. Важливо здійснювати пересівання з однієї ізольованої колонії в одну пробірку. Пробірки інкубують у термостаті протягом 48-72 год при температурі 40°C.

ТП 7.4 Вирощування культури в колбах на качалці

Готують колбу об'ємом 1 л з композицією Б, куди зливають композицію А і 7,56 г гліцерину у асептичних умовах і розливають у 2 колби по 500 мл, які містять 150 мл поживного середовища. Після цього клітини штаму *A. migulanus* суспендують, вносячи до пробірок з робочою культурою 5 мл фізрозчину. Далі суспензію вносять у колби з поживним середовищем, закривають марлевою пробкою і культивують штамп на качалках при температурі 40°C із частотою 220 обертів на хвилину протягом 48 год.

ТП 7.5 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 5 л

На даному етапі у стерильний посівний апарат об'ємом 5 л, з дотриманням правил асептики, додають композицію Б (ДР 6.2.2) і композицію А (ДР 6.2.1) і 75,6 г гліцерину. Включаючи перемішувач, додають простерилізований розчин натрій гідроксиду (з ДР 3.1) до нейтрального значення рН 7. Далі через засівну колбу вносять інокулянт з колб у об'ємі 300 мл і починають процес культивування.

Культивують при температурі 40°C протягом 24-48 год. Перемішують у режимі 400 обертів на хвилину.

Мікробіологічний контроль проводиться кожні 8 годин культивації для переконання, що стороння мікробіота відсутня. Також проводиться вимірювання концентрації біомаси, використовуючи спектрофотометр. Передача інокуляту до наступного апарата

об'ємом 50 л здійснюється при досягненні оптичної щільності $OD_{600} = 0,8-1,2$, що відповідає приблизно $6-10 \cdot 10^8$ КУО/мл.

ТП 7.6 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 50 л

У стерильний посівний апарат об'ємом 50 л за допомогою насоса подають стерилізовану композицію Б (ДР 6.3.2), композицію А (ДР 6.3.1) і 756 г гліцерину. Суміш перемішують і за показаннями датчику рН, доводять значення рН до 7 за допомогою 6%-го розчину натрій гідроксиду (з ДР 3.2). Потім додають інокулят (ТП 7.5) через посівну колбу і починають процес вирощування культури.

Умови культивування: дотримують температуру 40°C і частоту обертів 400 об/хв. Тривалість культивування 24-48 год. Потім отриманий інокулят подають у посівний апарат об'ємом 500 л.

Мікробіологічний контроль виконується кожні 8 годин. Проби культури відбираються і мікроскопіюються у світловому мікроскопі, а також висіваються на чашки Петрі з МПА і ГКА. Також кожні 8 годин, використовуючи спектрофотометр, вимірюється концентрація біомаси *A. migulanus*. Інокулят можна подавати у посівний апарат об'ємом 500 л при досягненні оптичної щільності $OD_{600} = 0,8-1,2$.

ТП 7.7 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 500 л

У стерильний посівний апарат об'ємом 500 л при дотриманні асептичних умов подають насосом стерилізовану композицію Б (ДР 6.4.2), композицію А (ДР 6.4.1) і 7560 г гліцерину. Далі включають перемішуючий пристрій і додають 6%-й розчин натрій гідроксиду (з ДР 3.3), доводять значення рН до 7-ми. Потім через насос подають інокулят з посівного апарату на 50 л (ТП 7.6) і починають культивування.

Умови культивування: дотримують температуру 40°C і частоту обертів 400 об/хв. Тривалість культивування 24-48 год.

Мікробіологічний контроль культивування *A. migulanus* проводиться кожні 8 годин. Відбувається як мікроскопіювання, так і висів на агаризовані поживні середовища. Культивування штаму на цьому етапі зупиняється при досягненні значення оптичної щільності $OD_{600} = 0,8-1,2$ при використанні спектрофотометра. Далі отриманий інокулят подають у ферментер об'ємом 5 м³ для подальшого біосинтезу грамїцидину.

ТП 8 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 5 м³

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 5 м³ в асептичних умовах вносять стерильне поживне середовище: композицію А (ДР 6.5.1), композицію Б (ДР 6.5.2), гліцерин і розчин лугу (6% розчин натрій гідроксиду (з ДР 3.4)) доки показник датчика рН не досягне 7. Далі перемішують ці розчини за допомогою перемішуючого пристрою, який обертається 150-300 разів на хвилину, і додають посівний матеріал (ДР 7.7) через насос з посівного апарату об'ємом 500 л. За даними показників задають умови тиску 0,5 АТМ і температури 40°C. Культивуація повинна проводитися при обов'язковій аерації при показнику насичення киснем $pO_2 = 1,25 \text{ O}_2/\text{м}^3$ на годину. Під час ферментації, рН підтримують за допомогою титрувальних розчинів (ДР 4.1, ДР 4.2), використовуючи автоматичну систему регуляції рН. Піну, що утворюється контролюють піногасником, що був попередньо простерилізований (ДР 5). Орієнтовно процес біосинтезу триває 48 год і припиняється при досягненні значення концентрації граміцидину 2 г/л.

Під час біосинтезу граміцидину проводять такі види контролю: мікробіологічний контроль (мікроскопіювання і висів на агаризовані поживні середовища); спектрофотометрія для визначення концентрації біомаси; високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) для визначення концентрації граміцидину; спектрофотометрія для визначення вмісту джерела Карбону і Нітрогену для відображення ефективності біосинтезу.

РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення граміцидину

Виділення та очищення граміцидину після завершення процесу біосинтезу є важливим етапом біотехнологічного процесу. Оскільки отриманий граміцидин використовується у медицині, до нього висуваються підвищені вимоги щодо ступеня чистоти та якості кінцевого продукту.

Враховуючи, що біосинтез антибіотику відбувається у ферментері об'ємом 5 м³, процес його виділення та очищення повинен бути технологічно обґрунтованим і економічно доцільним для умов невеликого сезонного промислового виробництва. Тому при виборі методу очищення необхідно враховувати як властивості цільового продукту, так і можливість масштабування окремих стадій процесу.

Метою даного розділу є огляд існуючих підходів виділення граміцидину з біомаси *A. migulanus* та обґрунтування схеми його очищення.

7.1. Відділення біомаси після завершення біосинтезу *A. migulanus*

У процесі культивування *A. migulanus* граміцидин накопичується переважно у біомасі клітин та практично не переходить у культуральну рідину. Це зумовлює необхідність відділення біомаси з подальшою екстракцією цільового продукту з клітинного матеріалу. [7]

Для відділення клітинної біомаси від культуральної рідини, доцільно використати метод центрифугування, який широко використовується у біотехнологічних виробництвах для розділення суспензій. [9]

Центрифугування – це метод розділення неоднорідних систем на рідку та тверду фази під дією відцентрових сил. Таким чином, мікроорганізми, що мають більшу густину порівняно з культуральною рідиною, утворюють осад з утворенням концентрованої біомаси, а супернатант відводиться окремо.

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ						
					РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГРАМІЦИДИНУ	Літ.			Арк.	Аркуші	
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата					57	73	
Розроб.		Князева Я.О.									
Консульт.											
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ					
Н. Контр.											
Зав. каф.		Стабніков В.П.									

Альтернативними методами розділення біомаси та культуральної рідини є фільтрація та сепарація. Однак застосування даних методів є недоцільним через низку недоліків.

Фільтрація ускладнюється швидким закупорюванням пор фільтру клітинною масою та компонентами поживного середовища. Враховуючи використання поживного середовища на основі гліцерину, який підвищує в'язкість культуральної рідини, продуктивність процесу буде занадто низькою.

Сепарація є ефективною для обробки великих об'ємів суспензій, проте характеризується високою вартістю обладнання, що є невиправданою для невеликого сезонного виробництва.

Таким чином, найбільш обґрунтованим вибором залишається центрифугування, до недоліків якого належать підвищені енерговитрати і можливе часткове руйнування клітин. Проте у даному випадку руйнування клітин не є критичним, а використання промислової центрифуги дозволяє забезпечити високу продуктивність процесу.

Для відділення біомаси пропонується використання тарілчастої осаджувальної центрифуги від британського виробника Alfa Laval BTUX 510, що забезпечує безперервне розділення бактеріальних суспензій. Даний апарат використовується на біотехнологічних підприємствах і придатна до СІР. Продуктивність центрифуги становить до 10 м³/год, частота обертання барабана становить 6000-9000 об/хв, потужність двигуна – 20-30 кВт. [27] Відділення біомаси *A. migulanus* відбувається впродовж 15 хв при швидкості 7500 об/хв і температурі 4°C. [7]



Рис 7.1 Центрифуга Alfa Laval BTUX 510 [27]

7.2. Виділення грамцидину з клітинної біомаси

Після відділення біомаси шляхом центрифугування наступною стадією біотехнологічного процесу є екстракція граміцидину з клітинного матеріалу. Оскільки антибіотик накопичується всередині клітин, його видалення можливе тільки використовуючи відповідні екстрагенти. [7]

Основною метою цього процесу є отримання розчину граміцидину в етанолі, який далі очищується, сушиться і пакується.

Важливою характеристикою граміцидину, яка впливає на вибір подальших технологічних процесів, є його розчинність. Він практично не розчинний у воді, проте добре розчиняється в органічних розчинниках, зокрема в етанолі, а також у водно-спиртових сумішах за умови зниженого значення рН. Ця особливість обґрунтовує використання органічних екстрагентів для виділення граміцидину з біомаси клітин.

Враховуючи стабільність граміцидину в кислому середовищі, застосування підкислених розчинів не призводить до його деградації. Водночас антибіотик є досить чутливим до підвищених температур, тому процеси відділення і подальшої обробки повинні проводитися за помірних температурних режимів.

Сильні органічні розчинники, наприклад ацетон або хлороформ забезпечують високий рівень виділення, але через їх токсичність використовуватися не можуть.

У сучасній науковій літературі для виділення граміцидину з біомаси переважно використовують наступні екстрагенти: етанол, підкислена водно-спиртова суміш та буферні розчини. Кожен підхід має свої переваги і недоліки.

Через свою нерозчинність у воді, застосування буферних розчинів для екстракції граміцидину характеризується нижчою ефективністю у порівнянні з іншими екстрагентами. Хоча цей метод є більш екологічно безпечним і технологічно простим, його використання зумовлює значні втрати цільового продукту і необхідністю додаткових стадій екстракції.

Органічні розчинники, зокрема етанол, показують значно вищу здатність до екстракції граміцидину. Перевагами використання етанолу є ефективність, доступність і відносна нетоксичність. Водночас під час екстракції нейтральним етанолом, можлива додаткова екстракція супутніх речовин, що ускладнює подальше очищення граміцидину.

Підкислення розчину етанолу значно підвищує ефективність екстракції, адже знижене значення рН сприяє легшому переходу граміцидину у рідку фазу. До переваг даного методу слід віднести високу селективність процесу, найвища концентрація граміцидину після екстракції (порівняно з іншими методами) та можливість використання м'яких температурних режимів. Недоліками цього методу є необхідність контролю значення рН, а також подальше видалення розчинника з екстракту.

Отже, розглянувши можливі методи виділення граміцидину з біомаси, використання підкисленого розчину етанолу є найбільш обґрунтованим варіантом для умов невеликого виробництва. [13]

Після відділення біомаси центрифугуванням, отриманий осад піддається екстракції граміцидину. З огляду на подальші етапи обробки біомаси, стадію її промивання можна виключити, оскільки більшість водорозчинних домішок не переходять в екстракт, а також цей етап є промислово невиправданим, адже він збільшує витрати води, енергії та часу не даючи суттєвого приросту чистоти екстракту.

Як екстрагент використовується суміш етанолу з додаванням хлоридної кислоти у пропорції 9:1. Далі екстракція відбувається у апараті з мішалкою при кімнатній температурі протягом 2 годин при постійному перемішуванні з частотою 300 об/хв. Співвідношення біомаси до екстрагенту підбирають таким чином, щоб забезпечити ефективний масообмін між фазами.

Після завершення екстракції суміш піддається повторному центрифугуванню для видалення відпрацьованої клітинної маси. Супернатант відбирається для подальшого очищення, адже він містить граміцидин. За необхідності екстракцію можна повторити з новою порцією екстрагенту для підвищення виходу цільового продукту. [13]

7.3.Очищення екстракту та кристалізація граміцидину

Після завершення стадії екстракції, отриманий екстракт містить домішки, залишки клітинних компонентів, пігменти та інші сполуки. Тому для отримання чистого граміцидину, який можна використовувати у фармацевтичних препаратах, екстракт знебарвлюють за допомогою активованого вугілля. Даний процес проходить перемішуючи суміш при кімнатній температурі. Далі отриману суміш фільтрують, а фільтр промивають етанолом для зменшення витрат граміцидину внаслідок сорбції.

Очищений екстракт концентрують і переводять грамідидин у тверду фазу методом кристалізації. Кристалізація – це процес переходу речовини з розчину у тверду кристалічну фазу внаслідок зниження її розчинності у середовищі. Цей метод є не лише ефективним для виділення цільового продукту, але і для його очищення, адже під час росту кристалів домішки не вбудовуються в кристалічну ґратку і залишаються у розчині.

Для підготовки екстракту до процесу кристалізації, його переносять до кристалізатора, розбавляють водою і додають концентрований розчин хлориду натрію, який є електролітом. Зміна іонної сили середовища знижує розчинність грамідидину і сприяє його випаданню в осад. Суміш для кристалізації нагрівається до температури 55-65°C, після чого її повільно охолоджують до 5°C, завдяки чому утворюються кристали грамідидину.

Сформовані кристали відокремлюють від розчину шляхом центрифугування, а потім утворений осад піддають вакуумному сушінню при температурі не вище 65°C. Дотримання температурних обмежень є важливим через термолабільність грамідидину. Висушений продукт за потреби подрібнюється і просівається для отримання однорідного порошку. [4]

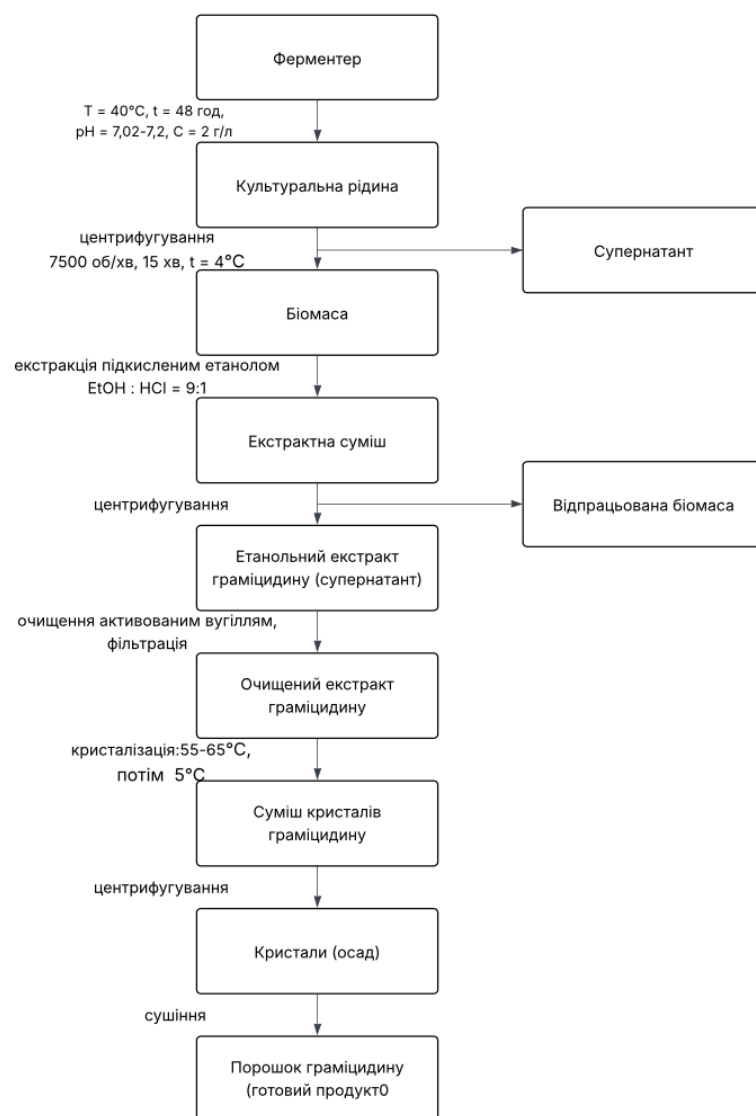


Рис. 7.2. Узагальнена схема етапів екстракції граміцидину

Таким чином, запропонована схема очищення екстракту і кристалізація граміцидину поєднує достатню якість очищення з відносною технологічною простотою і може бути використана в умовах невеликого сезонного виробництва без застосування складного високовартісного обладнання.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва грамїцидину

Під час культивування продуцента в інокуляторах та під час біосинтезу грамїцидину проби культуральної рідини відбираються кожні 8 годин. Це робиться для проведення мікробіологічного контролю, а також для контролю показників росту і біосинтезу. Вимірюється концентрація грамїцидину, біомаса продуцента *Aneurinibacillus migulanus* і концентрація джерел Нітрогену (оксалат амонію) та Карбону (гліцерин).

У процесі культивування відбувається автоматичний контроль значення рН середовища і концентрації титрувальних розчинів. Технологічний контроль виробництва передбачає визначення параметрів стерилізації поживних середовищ і обладнання (тиск, температура, тривалість процесу), а також параметрів підготовки аераційного повітря (тиск, температура, ступінь очищення, вологість).

8.1 Мікробіологічний контроль

Виробничий біосинтез грамїцидину С при культивуванні *Aneurinibacillus migulanus* виконується в асептичних умовах. Через це потрібно проводити мікробіологічний контроль на кожному етапі виробництва для переконання, що середовище не контаміноване сторонньою мікробіотою.

На стерильність перевіряють розчини композицій поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу, біосинтезу грамїцидину, а також 6%-го розчину луку (NaOH). Перевірку на сторонню мікробіоту проводять у посівному матеріалі і культуральній рідині під час біосинтезу грамїцидину С продуцентом.

Мікробіологічний контроль виробництва грамїцидину проводять двома шляхами: розсівом на агаризоване середовище і мікроскопіюванням.

					НУХТ БТЕК 05.01.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ГРАМІЦИДИНУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Князева Я.О.					63	73
Консульт.								
Керівник		Красінко В.О.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

8.1.1 Висів на агаризовані поживні середовища

Перевірка стерильності середовищ

Готують чашки Петрі з агаризованими середовищами: з м'ясопептонним агаром (МПА) і глюкозо-картопляним агаром (ГКА) для виявлення бактерій, грибів та дріжджів. Далі пробу розсівають по поверхні середовища за допомогою стерильної мікробіологічної петлі методом звичайного штриха. Засіяні чашки розміщують в інкубаторі і інкубують протягом 72 год при температурі $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Після проходження указанного часу, чашки досліджують на наявність бактеріального росту по штриху. Якщо середовище є стерильним, ріст повинен бути відсутнім.

Перевірка мікробіологічної чистоти біологічного агента методом мікроскопіювання

Зразок культуральної рідини висівають на чашки Петрі з м'ясопептонним агаром (МПА) для того щоб виявити сторонні бактерії. Також висівають на глюкозо-картопляний агар (ГКА) для виявлення колоній дріжджів і грибів.

Мікроскопіюють на світловому мікроскопі використовуючи спосіб імерсії. Готують препарат наступним чином: на чисте предметне скло за допомогою стерильної петлі наносять краплю культуральної рідини, після чого розподіляють мазок до діаметру в 1 см. Препарат залишають на повітрі до повного висихання і фіксують, обпалюючи в полум'ї спиртівки. Потім мазок фарбують за Грамом: накривають препарат фільтрувальним папером і наносять 2-3 краплі кристалічного фіолетового. Через 2 хвилини знімається папір і мазок обробляється дистильованою водою. Далі на нього додається розчин Люголя, а через 1-2 хвилини фарба зливається, зразок обробляється спиртом (20-30 секунд), промивається дистильованою водою і фарбується водним розчином фуксину. Після промивання та висушування, на препарат наноситься 1-2 краплі імерсійного масла і розглядають під імерсійною системою мікроскопа. Даний метод дозволяє побачити як грампозитивні бактерії, які будуть пофарбовані у фіолетовий колір, так і грамнегативні, які будуть червоного кольору. [28]

Якщо стороння мікробіота відсутня, можна спостерігати клітини *A. migulanus*: палички довжиною 4-8 мкм, шириною 0,6-0,7 мкм. Утворюють спори з овальними краями розміром 0,8-1,0 мкм, мають джгутики. Бактерії є грампозитивними, тому

будуть забарвлені у фіолетовий колір. Розташовані поодинокі або короткими ланцюжками. [4]

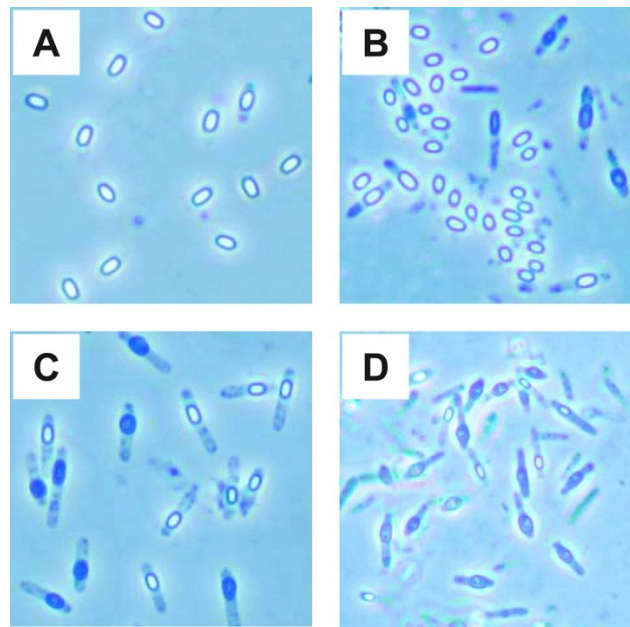


Рис 8.1 Мікроскопіювання клітин *A. migulanus* [7]

8.2 Показники росту і синтезу граміцидину

8.2.1 Визначення концентрації біомаси

Визначення концентрації біомаси штаму *A. migulanus* під час культивування проводиться за допомогою методу спектрофотометрії. Для цього потрібен спектрофотометр з кюветами зі скла із шляхом світла 1 см і довжиною хвилі світла 600 нм (OD_{600}).

Відбирається проба: перша порція (приблизно 5 мл) зливається, оскільки може містити застійну рідину, а друга порція (1-2 мл) набирається у пробірку. Піпеткою набирається 1 мл проби і переноситься у чисту суху кювету.

Спектрофотометр калібрується і кювета встановлюється у прилад. Для холостого зразка береться зразок поживного середовища без культури продуцента. Далі проводяться вимірювання оптичної густини і за калібрувальним графіком, який був складений за стандартними значеннями клітинної концентрації *Aneurinibacillus migulanus*, визначаємо концентрацію біомаси. [7]

8.2.2 Визначення концентрації граміцидину

Для визначення концентрації грамїцидину С під час процесу культивування використовували метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) після попередньої екстракції.

Концентрацію грамїцидину вимірюють кожні 4 години. Аліквоти у 1 мл відбираються з культуральної рідини і центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 10 хв при кімнатній температурі для видалення біомаси і заморожують при температурі -20°C. Далі пелети суспендують у розчині 150 мМ натрій хлориду і 20 мМ хлоридної кислоти і інкубують за температури 80°C протягом 15 хвилин. Суспензію розводять етанолом у пропорції 1:1. Грамїцидин екстрагують шляхом агітації (інтенсивного перемішування протягом години при температурі 30°C). Залишки клітин видаляють центрифугою і кількість грамїцидину С у 50%-му етанольному екстракті визначають або за допомогою біоаналізу, або безпосередньо методом хроматографії. [9]

Кількісне визначення грамїцидину за допомогою біоаналізу

Кількісна оцінка концентрації грамїцидину в культуральній рідині здійснюється на основі визначення біологічної активності антибіотика методом дифузії в агар з подальшим перерахунком у концентрацію за калібрувальною кривою, побудованою на основі результатів ВЕРХ. В якості тест-організму використовується *Bacillus cereus var. mycoides* 537 у концентрації $8 \cdot 10^6$ спор/мл. [29]

Екстракт грамїцидину розводять у 2,4,5,10 разів і по 50 мкл кожного розведення вносять у лунки діаметром 9 мм, зроблені в бакто триптонному агарі, засіяного споровою культурою тест-організму (доза $8 \cdot 10^6$ спор/мл). Щоб полегшити дифузію грамїцидину через агар, чашки охолоджують при температурі 4 °C протягом 22 годин перед інкубацією при температурі 37 °C протягом 20 годин.

Калібрувальні криві для зони затримки росту бактерій отримують за допомогою даних високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) для чистого грамїцидину. Чистий розчинник (50% етанол) використовують як негативний контроль, адже він не виявляє антибактеріальної активності. [9]

Кількісне визначення грамїцидину за допомогою хроматографії

Для визначення низьких концентрацій грамїцидину методом зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ЗФ-ВЕРХ) 0,5 мл кожного екстракту

спочатку висушили у вакуумному концентраторі, а потім розчинили у 50 мкл 50% етанолу, щоб отримати концентрацію у 10 разів вищу за початкову.

Хроматографію проводять у хроматографічній системі фірми Jasco Germany GmbH (Gross-Umstadt, Німеччина)[30], яка обладнана діодним масивним детектором. Використовують аналітичну зворотно-фазову колонку Vydac C₁₈ (4,6 × 250 мм) від Grace Davison Discovery Sciences (Deerfield, IL, США)[31] з лінійним градієнтом вода/ацетонітрил (релевантна частина градієнта: 45 до 90% В за 15 хв) при 35 °С.

Суміш з 10% ацетонітрилу та 90% води використовували як Розчинник А, а Розчинник Б складався з 90% ацетонітрилу і 10% води; обидва розчинники містили 5 мМ HCl як агент іонного спарювання. Для всіх зразків застосовували стандартний об'єм ін'єкції 20 мкл. Загальну площу піку граміцидину визначали за допомогою програмного забезпечення Jasco ChromPass на довжині хвилі 257 нм як міру концентрації. Були побудовані дві окремі калібрувальні криві для діапазонів 10–100 мг/л і 0,1–1 г/л.[9]



Рис 5.1 Система 3Ф-ВЕРХ Jasco HPLC [30]

8.2.3 Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену

Для контролю ефективності метаболізму та оптимізації використання поживного середовища, є необхідним визначення джерел Карбону та Нітрогену. Основним джерелом Карбону є гліцерин, а джерелом Нітрогену є оксалат амонію. Перед визначенням вмісту цих компонентів, культуральну рідину центрифугують при 6000

об/хв протягом 15 хв при 4°C для відділення біомаси. Для аналізу використовується супернатант.

Для визначення кількості гліцерину використовується високоефективний набір для тестування (Glycerol Assay Kit, Sigma-Aldrich) [32], який використовує ензимні реакції з гліцеролкіназою та гліцеролфосфатоксидазою для окиснення гліцерину, що у свою чергу утворює хіноніміновий барвник рожево-червоного кольору і інтенсивність забарвлення може бути визначена спектрофотометром (чим інтенсивніше забарвлення, тим більше гліцерину міститься у зразку). Для аналізу використовується спектрофотометр з довжиною хвилі вимірювання 570 нм. Згідно інструкції, розводяться реагенти у буфері і додається субстратна суміш. Об'єм зразка становить 50 мкл, а об'єм суміші становить 100 мкл. Після цього реакція інкубується при температурі 37°C протягом 30 хв. [32]

Після завершення реакції суміш переноситься у лунки спектрофотометра і вимірюється оптична щільність (OD_{570}). Для того, щоб проаналізувати кількісний склад гліцерину у суміші і побудувати графік, використовували стандартні зразки з концентраціями 0,2,4,6,8,10 нмоль на лунку. Потім результат вимірювання концентрації гліцерину у зразку порівнювали зі стандартами.

У результаті це дозволяє виміряти вільний гліцерин у культуральній рідині за допомогою колориметрії і через те, що використовувані ферменти зв'язуються лише з гліцерином, цей метод підходить для багатокомпонентного середовища, яке використовується у даному випадку.

Кількість вільного амонію також визначається за допомогою колориметрії. Для цього використовується набір для тестування (Ammonia Assay Kit, Sigma-Aldrich), який використовує реакцію о-фталальдегіду з амонієм/іоном амонію і утворює забарвлений продукт. [33]

Після центрифугування до зразка додають 50 мкл реагенту, який був підготовлений по інструкції виробника. Потім суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв. Вимірювали оптичну щільність на спектрофотометрі з довжиною хвилі 340 нм. Після вимірювання зразку, результат порівнюють зі стандартними значеннями. Приготування стандартів концентрації амонію аналогічна попередній стадії при визначенні концентрації гліцерину. [34]

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Український медичний часопис: Громадське обговорення клінічних протоколів: тонзиліт (Устінов О.В.) - [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://umj.com.ua/uk/novyna-97411-gromadske-obgovorennya-klinichnih-protokoliv-tonzilit?utm_source=chatgpt.com
2. Машейко, А.М. (2017) Аналіз захворюваності на гострий фарингіт і тонзиліт та їх постстрептококових ускладнень у дітей в Україні. Соціальна фармація в охороні здоров'я. Т. 3 (№ 1), 14-22 ст.
3. Guan Q. Huang S., Jin Y., Campagne R. et al. Recent advances in the exploration of therapeutic analogues of Gramicidin S, an old but still potent antimicrobial peptide. Journal of Medicinal Chemistry. 2019; 62(17): 7603-7617. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00156
4. Pat. EP3467098A1 European Patent Office. Process for the production of gramicidin using *Aneurinibacillus migulanus*; Bulletin 2019/15; Appl. 19.05.2017; Publ. 10.04.2019.
5. Pfukwa N. B. C., Rautenbach M., Hunt N. T. et al. Temperature-Induced Effects on the Structure of Gramicidin S. J. Phys. Chem. B. 2023; 127(17): 3774–3786. doi: 10.1021/acs.jpcc.2c06115
6. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. Biochemistry. Fifth edition / W. H. Freeman and Company, 2002 – p. 88
7. Berditsch M., Afonin S., Ulrich A. The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) To Produce the Antibiotic Gramicidin S Is Correlated with Phenotype Variation. Applied and Environmental Microbiology. 2007; 73. doi: [10.1128/AEM.00881-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00881-07).
8. Swierstra J., Kapoerchan V., Knijnenburg A., van Belkum A., Overhand M. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016; 35: 763-769. doi: 10.1007/s10096-016-2595-y
9. Bereditsch M., Afonin S., Steineker A., Orel N. et al. Fermentation and Cost-Effective ¹³C/¹⁵N Labeling of the Nonribosomal Peptide Gramicidin S for Nuclear Magnetic Resonance Structure Analysis. Applied and Environmental Microbiology. 2015; 81(11): 3593–3603. doi: 10.1128/aem.00229-15.

10. Інструкція для медичного застосування репарату Граммідин (Grammidin). URL: <https://medbrowse.com.ua/ua/grammidin-instrukcija>
11. Нормативно-директивні документи МОЗ України. Інструкція для застосування Софрадекс®. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=7155>
12. Аптека «Мир»: Dermacombin Cream 5g. URL: <https://mir-apteka.com/uk/catalog/preparaty-s-izrailya/dermacombin-cream-5g>
13. Lvova K., Vecino X., Perez-Cid et al. Efficient one step extraction process of Gramicidin S from *Aneurinibacillus aneurinilyticus* biomass. Front. Bioeng. Biotechnol. 2024; 12(1452796). doi: 10.3389/fbioe.2024.1452796
14. Українські національні новини (UNN): В Україні завершився епідсезон: на ГРВІ перехворіли понад 4,6 млн людей. – URL: <https://unn.ua/news/v-ukraini-zavershyvsia-epidsezon-na-hrvi-perekhvorily-ponad-46-mln-liudei>
15. GAOK 5L Bioreactor. URL: <https://www.gaokbio.com/bioreactor-fermenter/glass-bioreactor-fermenter/5l-bioreactor.html>
16. UkrChemGroup Скляний хімічний реактор на 50 л з сорочкою. URL: <https://ukrchemgroup.com/ua/p1331234280-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html>
17. Sealing Перистальтичний насос B-FCD 0601 230V. URL: <https://sealing.com.ua/ua/pumps/peristaltic-pumps/peristaltichniy-nasos-b-fcd-0601-230v/>
18. Lab1st e-shop 50L Stainless Steel Bioreactor for Microbial Fermentation with 2 Gas Inlets BR500-M1/. URL: https://eshop.lab1st.com/products/50l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-fermentation-with-2-gas-inlets-br500-m1?srsId=AfmBOoq05ZZs6k7WJGF4BvWsltSpFigEimYqJ_fe70plcce6hDtQvfbv
19. Made-in-China Yalian 500 Litre Chemical Batch Reactor. URL: <https://yalian.en.made-in-china.com/product/KmhYQFyvCGRS/China-500-Litre-Chemical-Reactors-Batch-Reactor-500L.html>
20. Albin Pump ALP Peristaltic Pump. URL: <https://azure-na-assets.contentstack.com/v3/assets/bltc3c6c3aa5f03359d/bltcbb05b8a7efecf7b/6810816a4d6edc65fb79d072/alp-brochure-2018-gb.pdf>

21. Lab1st e-shop 500L Stainless Steel Bioreactor for Cell Culture with 4 Gas Inlets BR500Pro-C1. URL: https://eshop.lab1st.com/products/500l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-and-cell-culture-br500-c1?_pos=1&_sid=fa0f183a3&_ss=r
22. Lab1st e-shop 150L Stainless Steel Chemical Reactor JSR-B Series. URL: <https://eshop.lab1st.com/products/stainless-steel-reactor-with-jacketed-system?variant=49957453922599&country=US¤cy=USD&utm.com>
23. Sysbiotech Industrial-scale bioreactor 1000-5000L. URL: <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-1000-5000l/>
24. Speroni CAM 150/200 Pump. URL: <https://www.speroni.it/en/articolo/cam-150-200/>
25. YHCHEM Stainless Steel Reactor. URL: <https://www.yuanhuaiglobal.com/product-reaction-kettle-adjustable-speed-chemical-reaction-vessel-with-stirring-device-small-laboratory-stainless-steel-reactor>
26. Sysbiotech Industrial-scale fermenter 1000-5000L. URL: <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-fermenter-1000-5000l/>
27. Alfa Laval BTUX Industrial Nozzle Centrifuge. URL: <https://www.alfalaval.co.uk/products/separation/centrifugal-separators/separators/btux/>
28. Paray A.A., Singh M., Mir M.A., Kaur A. Gram staining: a brief review. International Journal of Research and Review. 2023; 10(9): 336–341. doi: [10.52403/ijrr.20230934](https://doi.org/10.52403/ijrr.20230934).
29. Державна фармакопея України. – 1-ше вид. Доповнення 4 – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011 – с. 123
30. Jasco: Spectroscopy and Chromatography [Електронний ресурс]. URL: <https://www.jasco.de/>
31. VYDAC® chromatography resins for biopurification and custom bonding [Електронний ресурс]. – Grace Davison Discovery Sciences. – URL: <https://grace.com/products/vydac/>
32. Glycerol Assay Kit MAK117 [Електронний ресурс]. – Sigma-Aldrich. – URL: <https://www.sigmaaldrich.com/GB/en/product/sigma/mak117>

33. Ammonia Assay Kit MAK310 [Электронный ресурс]. – Sigma-Aldrich. – URL: <https://www.sigmaaldrich.com/GB/en/product/sigma/mak310>
34. Quantification Methodology of Ammonia Produced from Electrocatalytic and Photocatalytic Nitrogen/Nitrate Reduction <https://www.mdpi.com/1996-1073/16/1/27?utm>
35. Alenezi F., Rekik I., Belka M., Ibrahim A. et al. Strain-level diversity of secondary metabolism in the biocontrol species *Aneurinibacillus migulanus*. Microbiological Research. 2016; 182: 116-124. doi: 10.1016/j.micres.2015.10.007.
36. Alenezi F., Rekik I., Bouket A., Luptakova L. et al. Increased Biological Activity of *Aneurinibacillus migulanus* Strains Correlates with the Production of New Gramicidin Secondary Metabolites. Frontiers in Microbiology. 2017; 8(517). doi: 10.3389/fmicb.2017.00517.