

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

**Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю**  
**Кафедра біотехнології і мікробіології**

**«До захисту в ЕК»**

Директор інституту(декан факультету)

\_\_\_\_\_  
(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК  
(ім'я та прізвище)

«\_\_» \_\_ грудня \_\_ 2025 р.

**«До захисту допущено»**

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_  
(підпис) Віктор СТАБНИКОВ  
(ім'я та прізвище)

«\_\_» \_\_ грудня \_\_ 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Промислова та фармацевтична  
біотехнологія

на тему: Біотехнологія бактеріоцинів архей

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 1

ШАУЛЬСЬКИЙ Владислав Олександрович  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник БУЦЕНКО Людмила Миколаївна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) \_\_\_\_\_  
(підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_ (підпис)  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)  
(прізвище та ініціали)

Рецензент \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_  
(підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2025 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” жовтня 2025 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ШАУЛЬСЬКИЙ Владислав Олександрович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія бактеріоцинів архей

керівник роботи БУЦЕНКО Людмила Миколаївна, д.б.н., проф.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 911-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 26.11.2025

3. Вихідні дані до роботи цільовий продукт: галоцин, біологічний агент: *Haloferax volcanii*, кінцефа форма випуску: стоматологічний лак, схема виділення та очищення субстанції галоцину

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Потенціал архей: нові можливості в лікуванні, профілактиці та діагностиці захворювань. РОЗДІЛ 2. Біотехнологічне застосування ферментів архей. РОЗДІЛ 3. Перспективи біотехнологічного застосування архей. РОЗДІЛ 4. Галоцини – бактеріоцини архей. РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми одержання субстанції галоцину. РОЗДІЛ 8. Технологічні особливості отримання стоматологічного лаку, що містить галоцин. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 10. Проект заявки на корисну модель стоматологічного лаку

5. Перелік графічного матеріалу

Схема виділення та очищення субстанції галоцину – по 1 листу формату А1 апаратурної та технологічної схеми. Схема виробництва стоматологічного лаку - по 1 листу формату А1 апаратурної та технологічної схеми.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	РОЗДІЛ 1. Потенціал архей: нові можливості в лікуванні, профілактиці та діагностиці захворювань	01.10.2025 - 04.10.2025	
	РОЗДІЛ 2. Біотехнологічне застосування ферментів архей.	05.10.2025- 07.10.2025	
	РОЗДІЛ 3. Перспективи біотехнологічного застосування архей.	08.10.2025- 10.10.2025	
	РОЗДІЛ 4. Галоцини – бактеріоцини архей.	11.10.2025- 15.10.2025	
	РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування.	16.10.2025- 19.10.2025	
	РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу.	20.10.2025- 28.10.2025	
	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми одержання субстанції галоцину.	29.10.2025- 01.11.2025	
	РОЗДІЛ 8. Технологічні особливості отримання стоматологічного лаку, що містить галоцин.	02.11.2025- 03.11.2025	
	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	04.11.2025- 05.11.2025	
	РОЗДІЛ 10. Проєкт заявки на корисну модель стоматологічного лаку	06.11.2025- 08.11.2025	
	Оформлення графічної частини	09.11.2025- 15.11.2025	
	Оформлення пояснювальної записки	16.11.2025- 26.11.2025	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Владислав ШАУЛЬСЬКИЙ  
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Людмила БУЦЕНКО  
(ім'я та прізвище)

## ABSTRACT

The diploma thesis is devoted to the development of a dental antimicrobial varnish based on the peptide halocin KPS1, aimed at preventing dental caries and inhibiting the growth of *Streptococcus mutans*. The study analyzes the properties of halocin as a promising antimicrobial agent of archaeal origin and substantiates the feasibility of its incorporation into lacquer-form dental formulations.

The developed varnish contains a low-moisture polymer base (shellac, polyacrylate or urethane–acrylate resins) and an organic solvent, which ensure peptide stability and the formation of a durable transparent film on the enamel surface. The composition provides prolonged release of halocin over 8–24 hours, significantly exceeding the duration of action typical for conventional antiseptic varnishes.

The thesis presents a comparative analysis of known analogues, identifies their disadvantages, justifies the advantages of the proposed technology, and includes a drafted patent application for a utility model. It is demonstrated that incorporating halocin KPS1 into a film-forming polymer matrix ensures targeted antimicrobial activity against cariogenic bacteria, high adhesion of the composition to enamel, and long-lasting protective effects.

The work consists of an introduction, literature review, analytical section, technological development, patent section, conclusions, and a list of references (92 sources). The graphical part includes 7 figures and 14 tables, as well as two A1-format sheets with technological and equipment diagrams.

The obtained results can be applied in dental practice, scientific research, and in the further development of innovative preventive oral-care products.

*Keywords:* bacteriocins, antimicrobial peptides, halocin, dentistry, proteins, dental caries, *Haloferax volcanii* KPS1.

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню стоматологічного антимікробного лаку на основі пептиду галоцину KPS1 з метою профілактики карієсу та пригнічення росту *Streptococcus mutans*. У роботі проаналізовано властивості галоцину як перспективного антимікробного агента архейного походження та обґрунтовано доцільність його використання у складі лакоформених стоматологічних засобів.

Розроблений лак містить маловодну полімерну основу (шелак, поліакрилатні або уретан-акрилатні смоли) та органічний розчинник, що забезпечують стабільність пептиду та формування стійкої прозорої плівки на поверхні емалі. Композиція демонструє пролонговане вивільнення галоцину протягом 8–24 годин, що значно перевищує тривалість дії традиційних антисептичних лаків.

У роботі подано порівняльну характеристику відомих аналогів, визначено їхні недоліки, обґрунтовано переваги запропонованої технології та розроблено патентну заявку на корисну модель. Показано, що використання галоцину KPS1 у складі плівкоутворювальної основи забезпечує цілеспрямовану антимікробну дію проти карієсогенних бактерій, високу адгезію композиції до емалі та тривалий захисний ефект.

Робота містить вступ, огляд літератури, аналітичну частину, технологічну розробку, патентний розділ, висновки та список використаних джерел (92 статті). Наведено 7 рисунків та 14 таблиць. Графічну частину представлено по 2 листи технологічної та апаратурної схеми формату А1.

Основні результати можуть бути використані у стоматологічній практиці, наукових дослідженнях та при подальшому створенні інноваційних профілактичних засобів.

*Ключові слова:* бактеріоцини, антимікробні пептиди, галоцин, стоматологія, білки, карієс, *Haloferax volcanii* KPS1

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Потенціал архей: нові можливості в лікуванні, профілактиці та діагностиці захворювань.....	11
1.1 Археосоми та археальні газові везикули: Перспективи біотехнологічних застосувань у доставці ліків і вакцин.....	11
1.2 Роль глюкозодегідрогенази (GlcDH) з <i>Halobacterium mediterranei</i> в метаболізмі глюкози та її застосування в аналізі.....	13
1.3 Археоцини: нові протимікробні білки архей та їх потенційне застосування в біомедицині.....	13
1.4 Потенціал архей у біомедицині: від лікування до профілактики захворювань.....	14
1.5 Діагностика захворювання та перевірка ефективності препарату...	17
1.6 Бактеріородопсин: екстремофільний білок з потенціалом у біоелектроніці та біотехнології.....	18
1.7 Нанобіотехнології.....	19
1.8 Застосування екстремозимів архей у харчовій промисловості: потенціал та виклики.....	20
РОЗДІЛ 2. Біотехнологічне застосування ферментів архей.....	23
2.1 Протеолітичні ферменти (ЕС 3.4.xx).....	23
2.2 Естерази (ЕС 3.1.1.1) і ліпази (ЕС 3.1.1.3).....	25
2.3 Глікозилгідролази (ЕС 3.2.1.x).....	27
2.4 Ферменти, що переробляють ДНК.....	34
РОЗДІЛ 3. Перспективи біотехнологічного застосування архей.....	37
3.1 Інноваційні процеси бродіння для виробництва біомаси архей, ферментів і метаболітів .....	37
3.2 Стратегії клонування та експресії архейних ферментів та їх промислове використання.....	40
3.3 Промисловий потенціал архейних ферментів і метаболітів.....	45
РОЗДІЛ 4. Галоцини – бактеріоцини архей.....	53

4.1. Загальні відомості про галоцини та їх біохімічні особливості.....	53
4.2. Продуценти галоцинів.....	55
РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування.....	57
5.1. Характеристика галоцину.....	57
5.2. Огляд ринку цільової (аналогічної) продукції.....	62
5.3. Визначення концентрації галоцину.....	65
5.4. Розрахунок річної потужності виробництва.....	67
РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу.....	73
6.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання галоцину.....	73
6.1.1. Обґрунтування етапу одержання супернатанту з позаклітинним галоцином.....	74
6.1.2. Обґрунтування необхідності одержання супернатанту, вільного від клітин.....	76
6.1.3. Обґрунтування стадії концентрування та часткового очищення галоцину.....	78
6.1.4. Обґрунтування використання хроматографічних методів для остаточного очищення галоцину.....	80
6.1.5. Обґрунтування стадії сушіння та стабілізації галоцину.....	81
6.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	82
6.3. Специфікація обладнання.....	85
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми одержання субстанції галоцину.....	90
РОЗДІЛ 8. Технологічні особливості отримання стоматологічного лаку, що містить галоцин.....	92
8.1. Обґрунтування вибору товарної форми випуску стоматологічного лаку, що містить галоцин.....	92
8.2. Специфікація обладнання.....	97

8.3. Опис технологічного процесу.....	99
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.....	102
9.1. Контроль субстанції.....	102
9.2. Методи контролю стоматологічного лаку.....	104
РОЗДІЛ 10. Проєкт заявки на корисну модель стоматологічного лаку.....	108
10.1. Галузь і застосування корисної моделі.....	108
10.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки.....	108
10.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення.....	109
10.4. Опис запропонованого способу.....	110
10.5. Формула корисної моделі.....	110
10.6. Реферат.....	111
ВИСНОВКИ.....	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	113

## ВСТУП

Сучасна стоматологія стикається з надзвичайно високою поширеністю карієсу, який залишається однією з наймасовіших патологій порожнини рота у світі. За даними ВООЗ, до 90% дорослого населення планети має досвід каріозних уражень зубів (Heng, 2016), а в Україні цей показник сягає близько 92% (<https://stomaestet.com.ua/dental-service/dental-treatment/caries-treatment/>).

Карієс не лише призводить до втрати зубів і погіршення якості життя, а й асоціюється з розвитком ускладнень — запальних процесів у порожнині рота, порушень травлення, підвищення ризику серцево-судинних і метаболічних захворювань (Zaman, Alam, & Razzaque, 2025).

Традиційні методи профілактики і лікування карієсу, зокрема застосування фторидів, антисептиків і кальцій-фосфатних препаратів, мають доведену ефективність, але не завжди забезпечують тривалу антибактеріальну дію, особливо проти специфічних карієсогенних мікроорганізмів (Featherstone, 2000). Одним із провідних збудників карієсу вважається *Streptococcus mutans*, здатний формувати біоплівки та знижувати рН у порожнині рота, що сприяє демінералізації емалі (Lemos et al., 2019). Саме тому актуальним напрямом сучасної біотехнології є пошук нових біологічно активних сполук, здатних ефективно пригнічувати ріст карієсогенних бактерій (Cao et al., 2025).

Серед перспективних агентів увагу привертають бактеріоцини — низькомолекулярні білкові або пептидні сполуки, що синтезуються мікроорганізмами для пригнічення споріднених або патогенних видів. Вони відзначаються специфічністю дії, здатністю руйнувати клітинні мембрани або порушувати внутрішньоклітинні процеси в мішенях, а також відносною безпечністю для макроорганізму. Успішне використання бактеріоцинів у харчовій промисловості (наприклад, нізину) доводить перспективність цієї групи речовин у медицині та стоматології (Darbandi et al., 2022).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ІІЗ</i>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>	Лім.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Шаульський В.О.						8	123
Перевір.		Буценко Л.М.							
Реценз.									
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							<i>Кафедра БТМ</i>

Особливим різновидом бактеріоцинів є галоцини — антимікробні білки та пептиди, які продукують археї, зокрема представники роду *Halobacterium* та *Haloferax*. Їхня ключова перевага полягає у високій стабільності до дії температури, екстремальних значень рН та високих концентрацій солей, що робить їх придатними для застосування у фармацевтичних технологіях. На відміну від класичних антибіотиків, галоцини рідко спричиняють формування стійкості у мікроорганізмів, що суттєво підвищує їхню терапевтичну цінність (Kumar et al., 2021; Shand, & Leyva, 2007).

Продуцентом галоцину, який є предметом даного дослідження, виступає архей *Haloferax volcanii* штаму KPS1 (Kavitha et al., 2011). Цей мікроорганізм є модельним представником галофільних архей, що мешкають у середовищах з високою концентрацією солей. Встановлено, що галоцин KPS1 проявляє виражену антимікробну активність проти низки грампозитивних бактерій, зокрема *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus mutans*. В контексті стоматології особливе значення має здатність KPS1 інгібувати ріст *S. mutans*, одного з основних етіологічних чинників карієсу.

Актуальність теми дослідження полягає в необхідності пошуку інноваційних засобів профілактики карієсу, які б поєднували високу антимікробну ефективність, стабільність дії та безпечність для організму людини. Застосування галоцинів архейного походження у стоматологічній практиці є новим і практично не розробленим напрямом, що відкриває перспективи створення препаратів з унікальним механізмом дії. Використання галоцину KPS1 у формі зубного лаку може забезпечити тривалу локальну дію на поверхні зуба, зменшення бактеріального навантаження та профілактику рецидивів карієсу, що має значний соціально-економічний ефект.

З огляду на це, розробка препарату у формі зубного лаку з використанням галоцину KPS1 є актуальним завданням. Лакова форма забезпечує пролонговане вивільнення активної речовини, локальну дію на уражений зуб та зручність у клінічному застосуванні (Baik et al., 2021), а застосування біологічного агента архейного походження відкриває нові можливості для антибактеріальної

профілактики карієсу.

Метою даної кваліфікаційної роботи є обґрунтування доцільності використання галоцину KPS1, синтезованого *H. volcanii* (Kavitha et al., 2011), у стоматологічній практиці та розрахунок виробничої потужності підприємства для випуску препарату у формі зубного лаку.

Новизною роботи є застосування галоцину KPS1, що одержується шляхом культивування архей *H. volcanii* KPS1, для виробництва лаку для зубів з профілактичним ефектом проти карієсу (Kavitha et al., 2011).

## РОЗДІЛ 1

# ПОТЕНЦІАЛ АРХЕЙ: НОВІ МОЖЛИВОСТІ В ЛІКУВАННІ, ПРОФІЛАКТИЦІ ТА ДІАГНОСТИЦІ ЗАХВОРЮВАНЬ

### 1.1 Археосоми та археальні газові везикули: Перспективи біотехнологічних застосувань у доставці ліків і вакцин

Ліпосоми — це везикули, що складаються з концентричних подвійних ліпідних шарів, які чергуються з водними компартментами, які дозволяють утримувати сполуки всередині. Коли мембранні ліпіди використовуються для приготування ліпосом, в результаті чого виходить одна з різними атрибутами, відома як «археосома». Фізико-хімічні властивості цих ліпідів передаються археосомам, які виявляють надзвичайну стабільність у стресових ситуаціях (рис. 2), враховуючи, що ліпіди архей менш вразливі, ніж ліпіди мікроорганізмів, що належать до інших доменів. Як наслідок цих характеристик, було запропоновано використання археосом для біотехнологічних застосувань .

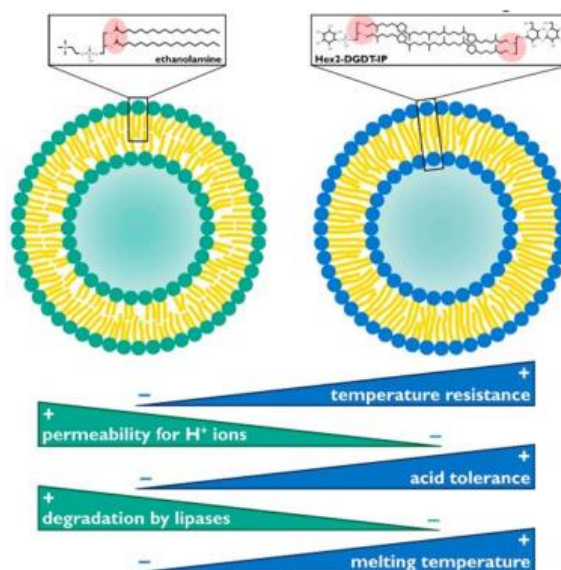


Рис. 1.1. Властивості археосом. Компіляція деяких властивостей археосом у порівнянні зі звичайними ліпосомами (Mainka, Weirathmüller, Herwig, & Pflügl, 2021).

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шаульський В.О.			РОЗДІЛ 1		
Перевір.		Буценко Л.М.			ПОТЕНЦІАЛ АРХЕЙ: НОВІ МОЖЛИВОСТІ В ЛІКУВАННІ, ПРОФІЛАКТИЦІ ТА ДІАГНОСТИЦІ ЗАХВОРЮВАНЬ		
Реценз.					Лім.	Арк.	Аркушів
Н. Контр.						11	123
Затверд.		Стабніков В.П.			<b>Кафедра БТМ</b>		

Археосоми мають більшу ефективність інкапсуляції, ніж ліпосоми, що збільшує їх герметичність і термін служби. Їхня стабільність така, що деякі з них можуть зберігатися в кисні майже без розпаду. Це разом із тим фактом, що клітини імунної системи ссавців реагують проти ліпідів, присутніх у мембран архей, робить археосоми ідеальними агентами для використання у введенні вакцин, діючи як каркаси для презентації антигену або безпосередньо як ад'юванти для стимуляції імунної системи та є біосумісними. Крім того, поглинання археосом фагоцитуючими клітинами відбувається легше, ніж звичайних ліпосом, і застосування імуностимуляторів не потрібно. Тому його міцність є важливою перевагою перед ліпосомами при обробці та зберіганні.

Кілька досліджень на мишах підтверджують такі програми. Вони також використовувалися як транспортери інсуліну та для внутрішньовенної доставки ліків у терапії раку. Крім того, археосоми також були запропоновані для трансфекції генів у клітинах ссавців. Крім того, вони можуть утворюватися при будь-якій температурі в фізіологічному діапазоні, сприяючи інкапсуляції термолабільних сполук. Тим не менш, виробництво архейних ліпідів обмежено невеликим масштабом біореакторів архейної ферментації та концентраціями отриманої біомаси, факторами, які обмежують її використання у великих масштабах.

Археальні газові везикули (GV) також з'являються як потенційні транспортні засоби для доставки ліків і для розробки вакцин. Везикули синтезуються чотирма видами галофільних архей (*Halobacterium salinarum*, *Haloferax mediterranei*, *Halorubrum vacuolatum* і *Haloquadratum walsbyi*) для регулювання їхньої плавучості в умовах низького рівня розчиненого кисню. GV по суті складаються з двох білків, розташованих навколо додаткових. Основними білками є GvpA зі структурною роллю та GvpC, розташований на поверхні та зі стабілізуючою функцією. Археальні газові везикули нетоксичні, ефективні, стабільні, імуногенні та проникні. Ця біологічна стабільність дозволяє їм стабільно представляти цікавий епітоп (Amoozegar, Siroosi, Atashgahi, Smidt, & Ventosa, 2017).

На відміну від археосом, рекомбінантні GV можна масштабувати завдяки їх легкому виробництву та обробці, оскільки клітини ефективно лізуються в низьких концентраціях солі. Крім того, вони залишаються стабільними без охолодження протягом тривалого часу і стійкі до хімічної або ферментативної деградації, що робить їх ідеальними для виробництва вакцин, призначених для країн, що розвиваються, де відсутні системи, необхідні для їх зберігання. Крім того, їх можна призначати людям з ослабленим імунітетом. Незважаючи на це, його виробництво зафіксовано лише в лабораторних масштабах.

### **1.2 Роль глюкозодегідрогенази (GlcDH) з *Halobacterium mediterranei* в метаболізмі глюкози та її застосування в аналізі**

Глюкозодегідрогеназа (GlcDH) (EC 1.1.1.47) з *Halobacterium mediterranei* бере участь у першому етапі модифікованого шляху Ентнер-Дудоров, який катаболізує глюкозу до пірувату. Це також відбувається в інших архей, таких як термоацидофіл *Sulfolobus solfataricus*, чий GlcDH використовується в комерційних наборах для аналітичних цілей, зокрема, для визначення рівня глюкози в крові (Ding, & Lai, 2010).

### **1.3 Археоцини: нові протимікробні білки архей та їх потенційне застосування в біомедицині**

«Археоцини» — це білки, що виділяються певними археями, мають потужну протимікробну дію та структуру, відмінну від бактеріальних антибіотиків (Askermann, 2007). Вони проявляють свою дію проти архей, пов'язаних зі штамом, що продукує археоцин, щоб конкурувати з ними, хоча вважається, що вони також активні проти решти Доменів. На сьогоднішній день знайдено лише два класи археоцинів: сульфолобіцини, що утворюються термоацидофілами порядку *Sulfolobales*, і галоцини, що утворюються галоархеями порядку *Halobacteriales*. Наприклад, галоцин KPS1 активний проти певних грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Пептид, схожий на катіонні антимікробні пептиди (СAMP), з активністю проти бактерій, грибів і найпростіших, був ідентифікований у *Sfb. islandicus*. Було показано, що цей пептид має антибіотичний характер широкого спектру дії.

Однак використання всіх цих сполук як ліків у біомедицині ускладнюється відсутністю знань про них через їх нещодавнє відкриття та відсутністю інформації про позитивні результати їх застосування. Крім того, культивування галоархей є складним, оскільки потрібні високі концентрації солі, що призводить до корозії біореакторів. Таким чином, необхідно використовувати корозійностійкі матеріали, що збільшує вартість процесу. Крім того, необхідно подолати технічні труднощі, пов'язані з подальшим очищенням цікавої сполуки, оскільки високий вміст солі часто не дозволяє використовувати хроматографію. Натомість лізис клітин можна здійснити, просто додавши надчисту воду. Крім того, галоцини є відносно стабільними при високих температурах і коливаннях рН і можуть зберігатися протягом тривалого часу (Haque, Paradisi, & Allers, 2020).

#### **1.4 Потенціал архей у біомедицині: від лікування до профілактики захворювань**

Велике метаболічне різноманіття архей та їх низькі потреби в харчуванні роблять їх корисними інструментами для відкриття нових ліків. Наприклад, хоча спочатку вважалося, що спектр дії галоцину  $\text{Hb}$  обмежений археями, Lequerica et al. виявили, що він також може пригнічувати  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмінник (NHE) у клітинах ссавців. Цей обмінник присутній у всіх доменах і бере участь у регуляції цитозольного рН. Натомість його дисфункція пов'язана із захворюваннями серця та високим кров'яним тиском. Якщо галоцин  $\text{Hb}$  використовується в цих умовах, то це дозволяє уникнути перевантаження катіонів у серцевих клітинах та запобігає пошкодженню міокарда. Таким чином, галоцин можна використовувати як кардіопротектор і для лікування гіперактивності NHE, а також для контролю артеріального тиску; оскільки він має більш високу специфічність дії, ніж інші інгібітори NHE, і викликає менше побічних ефектів, хоча все ще необхідні подальші дослідження.

Багато досліджень підтверджують терапевтичні властивості деяких речовин з галофільних архей. Наприклад, Safarpour et al. показали, що деякі метаболіти зі штаму *H. salinarum* мав потужний цитотоксичний ефект проти

клітинних ліній раку передміхурової залози людини, в той час як він не впливав на контрольну групу нормальних клітин.

По-друге, галоархеї є природним джерелом каротиноїдних пігментів, відомих своїми антиоксидантними та фотозахисними властивостями. Дослідження, проведені *in vivo* та *in vitro*, підтверджують, що каротиноїди з галоархей мають хіміопрофілактичну та протиракову дію. Нbt. каротиноїди галобактерій знижують життєздатність лінії ракових клітин HepG2 (карциноми печінки), зокрема каротиноїди *Haloplanus vesicus* і *Halogeometricum limi*. Крім того, дослідження з екстрактами цих архей показують, що вони можуть діяти як еритропротекторні агенти. Найпоширенішим каротиноїдом у більшості проаналізованих видів галоархей є бактеріоруберин (BRU), каротиноїд C50 на основі лікопіну. Вони також синтезують β-каротин, кантаксантин та інші каротиноїди у менших концентраціях. BRU може запобігати раку шкіри людини шляхом відновлення ланцюгів ДНК, пошкоджених іонізуючим УФ-випромінюванням. BRU, виділений із *Halobacterium volcanii*, також використовується для збільшення врожайності штучного запліднення в допоміжній репродукції. Тому необхідно дослідити потенціал галоархей для виробництва пігментів, корисних у біомедицині для лікування та профілактики захворювань. Оскільки галоархеї є природними джерелами каротиноїдів, протокол їх екстракції простий і дешевший, ніж з інших джерел, а синтез не завдає шкоди навколишньому середовищу. Однак масове накопичення каротиноїдів потребує низьких концентрацій NaCl, що може уповільнювати ріст клітин і навіть призводити до їх лізису (Kiadehi, Amoogear, Asad, & Siroosi, 2018).

Як і певні сполуки архей, що запобігають або лікують певні захворювання, археї можуть бути корисними як пробіотики, отримуючи назву «археобіотики». Наприклад, метаногенні археї *Methanomassiliicoccus luminyensis* запропоновані як біологічна терапія для лікування триметиламінуриї (ТМАУ) або синдрому запаху риби, а також для профілактики серцево-судинних захворювань і атеросклерозу. ТМАУ — це метаболічна аномалія, спричинена накопиченням

триметиламіну (ТМА) через нездатність організму розщеплювати його. Підвищений рівень ТМА в крові виділяється через піт, слину та сечу, спричиняючи неприємний запах (рис. 3). Це може призводити до психологічних і соціальних труднощів у хворих. Одним із можливих підходів є використання архей для обмеження накопичення ТМА. Михайловський та ін. показали існування археона *M. luminyensis* у людському кишечнику, а Brugère та ін. довели, що цей метаноген здатен використовувати метильовані сполуки (включаючи ТМА) як акцептори кінцевих електронів для отримання метану. Таким чином, терапевтичне застосування цього метилотрофного археона у пацієнтів із ТМАУ може допомогти метаболізувати і виснажувати ТМА у координації з його утворенням мікробіотою. (рис. 1.2).

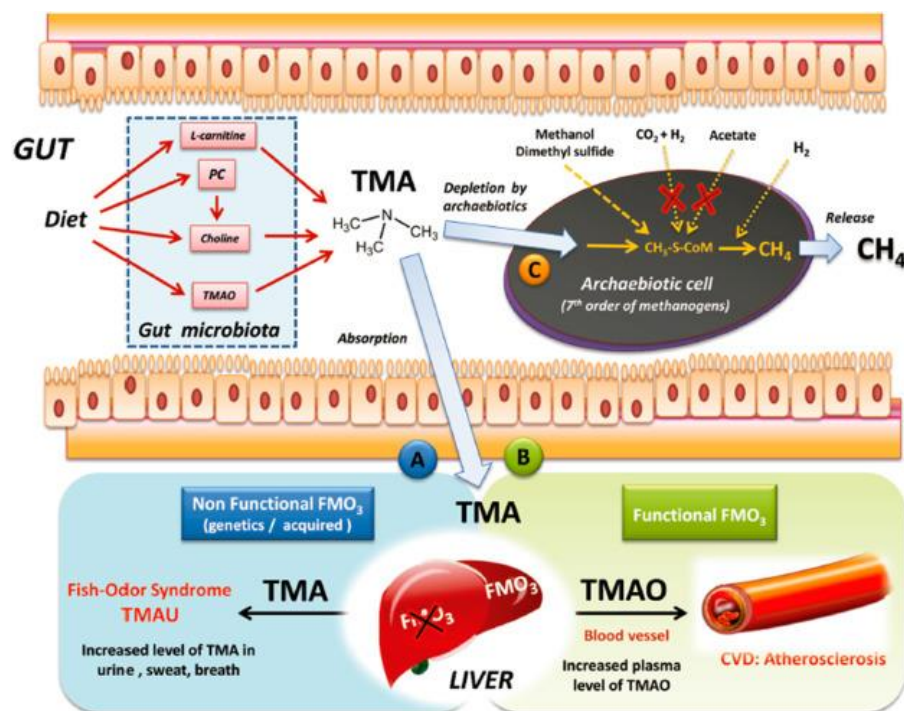


Рис. 1.2 Концепція археобіотики. Походження ТМА та його доля в організмі (Litchfield, 2011).

Крім того, використання цих археобіотиків може знизити ризик серцево-судинних захворювань і атеросклерозу. Це пояснюється тим, що зменшення рівня ТМА в крові сприяє зниженню утворення триметиламіноксиду (ТМАО), метаболіту з проатерогенними властивостями (рис. 1.2).

Використання архей для лікування ТМАУ має кілька переваг. По-перше, їх ідентифікація відбувається саме там, де вони повинні бути застосовані, тобто

в кишечнику. По-друге, їх можна легко викоринити за допомогою протимікробних препаратів, якщо лікування виявиться неефективним. По-третє, метан, який утворюється в результаті метаболізму ТМА, є біологічно інертним для людини в кількостях, які утворюються при цьому процесі. Крім того, замість використання живих клітин архей, можливе введення лише ферментів, що беруть участь у метаболізмі ТМА .

Однак є кілька перешкод, які необхідно подолати для їх використання як терапевтичних агентів. Археї потрібно транспортувати до кишечника в безкисневих умовах, оскільки вони чутливі до кисню. Також необхідно визначити, чи досягаються адекватні рівні архей у кишечнику для ефективного виснаження ТМА з клінічної точки зору, а також дослідити можливі побічні ефекти. На сьогодні *Methanomassiliicoccus luminyensis* не використовується як біотерапевтичний засіб для людини.

Багато бактерій виробляють дикетопіперазини, також звані циклічними дипептидами. Приблизно десять років тому було виявлено, що *Haloterrigena hispanica*, представник галоархей, також здатна їх продукувати. Дикетопіперазини мають широкий спектр медичних застосувань, але найцікавішою їхньою властивістю є здатність активувати або пригнічувати системи «чутливості до кворуму». Ці системи дозволяють бактеріям контролювати свою фенотипову експресію залежно від щільності клітин.

Ця властивість робить дикетопіперазини потенційними терапевтичними агентами проти патогенів, які використовують систему «чутливості до кворуму» для регулювання своїх генетичних програм і викликають інфекції у людей. Наприклад, *Pseudomonas aeruginosa* використовує цю систему для інфікування пацієнтів із кістозним фіброзом.

### **1.5 Діагностика захворювання та перевірка ефективності препарату**

Археї також можуть використовуватися для діагностики захворювань. Галоархейні газові везикули (GV) були випробувані як контрастні речовини в медичній діагностиці за допомогою ультразвукових і магнітно-резонансних методів. Білок, виділений із *Halobacterium halobium*, допомагає діагностувати

пацієнтів із раком товстої або прямої кишки завдяки здатності індукувати імунну відповідь і вироблення антитіл, які розпізнають продукт онкогену, пов'язаного з цим захворюванням (Rodrigo-Vaños et al., 2015).

Крім того, галоархеї чутливі до цитостатичних препаратів, що діють на ДНК-топоізомеразу II та компоненти цитоскелета, що робить їх придатними для тестування ефективності та попереднього відбору таких препаратів.

### **1.6 Бактеріородопсин: екстремофільний білок з потенціалом у біоелектроніці та біотехнології**

Найбільш актуальним екстремофільним білком у цій галузі є бактеріородопсин (BR), який виробляється галоархеями. Він став важливим на комерційному рівні завдяки численним застосуванням у біоелектроніці, і його виробляють багато компаній для різних потреб. BR асоційований із хромофором (сітківкою), що дозволяє йому захоплювати фотони.

Цей білок відзначається високою стійкістю до термічної, хімічної та фотохімічної деградації завдяки структурі у формі гексагональної мережі. Він має чудову термодинамічну та фотохімічну стабільність. Його каталітичний цикл, а також фотоелектричні, фотохромні та протонкінетичні молекулярні функції роблять BR ключовою молекулою для біотехнологічних застосувань. Крім того, його легко фіксувати на твердих опорах, що робить його привабливим для використання як:

- просторового модулятора світла,
- голографічного середовища,
- монітора з високою роздільною здатністю,
- оптичних біообчислювальних нейронних мереж,
- оптичних перемикачів,
- комп'ютерної пам'яті з більшим обсягом зберігання та

обробки, ніж CD-ROM.

BR також використовується для створення фотоелектричних елементів, які перетворюють сонячну енергію в електричну чи хімічну, і як нетоксичний мініатюрний комп'ютерний елемент (біочіп), здатний замінити кремнієві

мікросхеми. Інші застосування включають:

- розробку штучних сітківки ока, що ґрунтується на аналогії BR із зоровим родопсином у ссавців. Це дає змогу створювати імплантати для людей із розладами сітківки;
- біологічний камуфляж для військової форми завдяки здатності BR залишатися невиявленим певними детекторами, забезпечуючи ефективно приховування світла через дифракцію.

Одним із широко відомих застосувань BR є біосенсори, оскільки він дуже чутливий до зовнішніх стимулів (Singh, & Singh, 2017).

Хоча кілька галоархей здатні виробляти BR, *Halobacterium salinarum* є модельним організмом для його великомасштабного виробництва. В умовах обмеженого кисню та присутності світла до 75% загальної сухої маси його мембрани складається з цього білка.

Однак багато з цих застосувань нині втратили актуальність через технологічні інновації та створення нових матеріалів. У зв'язку з цим BR доступний лише в обмежених кількостях і за високими цінами.

## 1.7 Нанобіотехнології

Нанобіотехнологія — це багатодисциплінарна наука, що маніпулює речовинами живих організмів для створення нових структур, матеріалів і пристроїв в атомному масштабі. Ця галузь знайшла біотехнологічне застосування в різних сферах завдяки своїм інноваційним властивостям, таким як підвищена розчинність, високе співвідношення об'єму до поверхні та багатофункціональність.

Багато клітинних компонентів архей можуть забезпечити економічно ефективний спосіб виробництва наночастинок. Бактеріородопсин (BR) є особливо перспективним компонентом для інтеграції в наноструктури через його малий розмір. Завдяки здатності BR діяти як світлочутливий датчик, цей білок може збирати енергію сонячного світла, яку можна безпосередньо споживати або зберігати в світлових батареях (Voica et al., 2016).

Також повідомляється про потенціал галоархей для

внутрішньоклітинного синтезу наночастинок срібла, які мають антибактеріальну дію проти грампозитивних і грамнегативних бактерій. Менша токсичність таких наночастинок порівняно з іншими бактерицидними засобами робить їх перспективними для застосування в червоній біотехнології. Вони також знаходять використання як оптичні рецептори та елементи електричних батарей.

Глікопротеїни S-шару, розташовані в мембранах архей, є привабливими для нанобіотехнологій завдяки своїм фізико-хімічним властивостям. До таких властивостей належать здатність утворювати матриці та поверхні, а також пориста структура. Пори в S-шарі мають однаковий розмір і морфологію, а функціональні групи розташовані у визначених положеннях. Це дозволяє використовувати їх для створення ізопористих ультрафільтраційних мембран, біоаналітичних датчиків, афінних мембран і матриць для іммобілізації функціональних молекул.

### **1.8 Застосування екстремозимів архей у харчовій промисловості: потенціал та виклики**

У харчовій промисловості екстремозими випробовували, наприклад, для розм'якшення м'яса та освітлення фруктових соків. Зокрема, барофільні білки рекомендовано для виробництва та стерилізації продуктів, які потребують умов високого тиску.

Також використовують інші сполуки архейного походження. Наприклад, археосоми, завдяки своїй стабільності, пропонують для інкапсуляції харчових добавок і інгредієнтів. Каротиноїди, що виробляються галоархеями, застосовують як харчові добавки та барвники.

Галоархеї також використовують у процесах, що потребують високої концентрації солі. Вони є ідеальними кандидатами для виробництва ферментованих солоних продуктів, таких як корейські «jeotgal» (ферментовані морепродукти), «kimchi» (ферментована капуста) чи тайський рибний соус «nam-pla», популярний у Східній Азії. Виробництво ферментованих рибних соусів — дорогий і тривалий процес, що вимагає великих приміщень. Багато мікроорганізмів, виділених із цих продуктів, належать до сімейства

*Haloferacaceae*, що беруть участь у процесі через свої протеази.

Дослідження показали, що додавання галоархей може прискорити ферментацію, підвищуючи якість кінцевого продукту, зокрема його смак і аромат. Таким чином, використання галоархей може знизити витрати у виробництві ферментованих солоних продуктів.

Крім того, секреція галоцинів, що виробляються галоархеями, має перспективи для використання в харчовій промисловості як консерванти для солоних продуктів. Вони запобігають псуванню, пригнічуючи ріст інших галофільних мікроорганізмів.

Археї є перспективними кандидатами для виробництва безлактозного молока, яке необхідне людям із непереносимістю лактози для отримання кальцію та вітаміну D, що містяться в молоці. Зазвичай цей процес потребує використання лактази з мікробних джерел, що додає додатковий етап у обробці молока і збільшує ризик його забруднення. Однак термостабільні лактази, отримані з термофільних і гіпертермофільних архей, можуть усунути цю проблему. Вони здатні ефективно видаляти лактозу під час пастеризації, що запобігає росту шкідливих мікроорганізмів завдяки високій температурі.

Екзополісахариди (EPS), вироблені археями, зокрема термофілами та галофілами, мають численні застосування в харчовій промисловості. Вони використовуються як гелеутворювачі чи емульгуючі агенти через їхню високу в'язкість і здатність до загущення, а також як біоповерхнево-активні речовини, вироблені галоархеями.

Окремі види EPS можуть застосовуватись як покриття для харчових продуктів, особливо фруктів і овочів. Вони створюють плівку, яка запобігає потемнінню поверхні, зневодненню та втраті якості через окислення чи дифузіїю олії, що подовжує термін зберігання продуктів. EPS, вироблені археями, мають перевагу стабільності у високих концентраціях солі, на відміну від інших полісахаридів, таких як ксантан. Деякі EPS також стійкі до екстремальних значень рН і температур.

Попри те, що склад і кількість EPS генетично зумовлені, на них значно

впливають умови вирощування та тип субстратів. Більшість промислово вироблених EPS синтезуються патогенними мікроорганізмами. У цьому аспекті археї є більш безпечним джерелом, оскільки патогенів серед них досі не виявлено.

Однак існують проблеми: більшість досліджень архейних EPS зосереджені на вивченні їх біологічної функції, а не на пошуку практичних застосувань. Крім того, їхня вартість є вищою, а фізико-хімічні властивості часто гірші порівняно з EPS рослинного походження. Через це EPS, вироблені археями, на сьогодні не є економічно вигідними для комерційного виробництва, і жоден із них поки що не отримав широкого практичного застосування.

## РОЗДІЛ 2

### БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ ФЕРМЕНТІВ АРХЕЙ

#### 2.1 Протеолітичні ферменти (ЕС 3.4.xx)

Протеази каталізують гідроліз білків до менших пептидів або вільних амінокислот. Їх зазвичай поділяють на дві основні групи:

1. Ендопептидази – ферменти, які розщеплюють пептидні зв'язки всередині білка.
2. Екзопептидази – ферменти, що відщеплюють амінокислоти від кінців білка.

За механізмом каталізу протеази класифікують на такі типи:

- Серинові протеази (ЕС 3.4.21.x),
- Цистеїнові (тіолові) протеази (ЕС 3.4.22.x),
- Аспарагінові (карбоксільні, кислі) протеази (ЕС 3.4.23.x),
- Глутамінові протеази (ЕС 3.4.23.x),
- Треонін-протеази (ЕС 3.4.25.x),
- Металопротеази (ЕС 3.4.24.x).

Протеази мають значний інтерес завдяки їх різноманітним властивостям і широкому спектру застосувань у промисловості. Вони становлять значну частину глобального ринку ферментів.

Більшість протеаз, отриманих із екстремофілів, належать до серинового типу. Чимало таких ферментів походить від гіпертермофільних архей, зокрема представників родів *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Desulfurococcus*, *Pyrobaculum*, *Staphylothermus*, а також термоацидофільних архей, таких як *Sulfolobus* (див. табл. 2.1).

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</b>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.	Шаульський В.О.				<b>РОЗДІЛ 2 БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ ФЕРМЕНТІВ АРХЕЙ</b>					
Перевір.	Буценко Л.М.							Літ.	Арк.	Аркунів
Реценз.									23	123
Н. Контр.								<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.	Стабніков В.П.									

## Протеолітичні ферменти архей (Pirzadah, Malik, &amp; Hakeem, 2021)

Тип протеази	Організм	Тип ферменту	Властивості ферментів		
			Оптимальна температура (°C)	Оптимальний рН	Термостабільність
Серинові протеази	<i>Десульфорококовий</i> штам Tok 12 S 1	Рідна	95	7.2	70–90 хв, 95 °C
	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	Рідна	100–130	Нейтрально-лужний	Не повідомляється
	<i>Стафілотермус морський</i>	Рідна	90	9	Не повідомляється
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Рекомбінантний	100	7–11.5	100 хв, 100 °C
	<i>Haloferax lucentensis</i> VKMM 007	Рідна	60	8.0	> 30 хв, 60 °C
Тіол протеаза	<i>Pyrococcus horikoshi</i> OT3	Рекомбінантний	80	8.5	Не повідомляється
Кисла протеаза	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	Рідна	70	2	Не повідомляється

Крім того, існують протеази, отримані з галофільних архей, що належать до родів *Haloferax*, *Halobacterium*, *Natrinema* і *Natronomonas*. Ці ферменти є лужними протеазами, що функціонують при підвищеному рН, і деякі з них стабільні при високих температурах або в органічних розчинниках. Наприклад, протеаза з *Haloferax lucentensis* VKMM 007 демонструє максимальну активність при 60 °C і рН 8, і залишається активною в присутності різних полярних та неполярних розчинників, поверхнево-активних речовин і відновників (Golkar, Bagasra, & Pasa, 2014).

Протеази архей є важливими ферментами, що каталізують гідроліз пептидних зв'язків у білках і пептидах. Їхні унікальні властивості, пов'язані з екстремальними умовами середовища, роблять їх перспективними інструментами для численних застосувань у біотехнології. У харчовій промисловості протеази архей, зокрема галоархей, можуть використовуватися для покращення процесів ферментації. Вони здатні розщеплювати білки в продуктах харчування, що сприяє поліпшенню текстури, смаку та аромату.

Наприклад, їх використовують для виробництва ферментованих молочних продуктів, таких як сири, де протеази допомагають у коагуляції молока і покращенні кінцевої якості продукту.

У фармацевтичній промисловості протеази архей можуть слугувати для виробництва лікарських засобів і біологічно активних компонентів. Їхня здатність до специфічного розщеплення білків може бути використана для створення пептидних ліків, які мають високий терапевтичний потенціал. Крім того, протеази архей можуть бути корисними у діагностиці захворювань, оскільки вони здатні взаємодіяти з різними білками в організмі, що може бути використано для виявлення маркерів захворювань.

Завдяки своїй термостабільності та стійкості до екстремальних рН і солей, протеази архей можуть використовуватися в промислових процесах, що вимагають високих температур або специфічних умов. Це дозволяє зменшити витрати на енергію та підвищити ефективність виробництв. Вони також можуть бути застосовані в процесах очищення, наприклад, у видаленні забруднень у стічних водах.

В останні роки протеази архей привернули увагу у косметичній індустрії, де їх використовують для виробництва антивікових засобів. Їх здатність розщеплювати старі білки шкіри може сприяти покращенню її стану та зовнішнього вигляду. Вони також можуть використовуватися в засобах для очищення шкіри, оскільки допомагають видаляти мертві клітини та забруднення.

Протеази архей також можуть бути використані для покращення якості сільськогосподарських продуктів, зокрема в агрономії. Вони здатні розщеплювати білки в рослинних клітинах, що може сприяти покращенню засвоєння поживних речовин. Це особливо важливо в умовах обмеженого доступу до ресурсів, таких як вода або поживні речовини .

## **2.2 Естерази (ЕС 3.1.1.1) і ліпази (ЕС 3.1.1.3)**

Естерази та ліпази широко використовуються як біокаталізатори в біотехнології. Естерази (ЕС 3.1.1.1) каталізують гідроліз водорозчинних естерів з коротким ацильним ланцюгом. Натомість ліпази (ЕС 3.1.1.3) здійснюють

гідроліз довголанцюгових ацилгліцеринів, розщеплюючи їх на гліцерин і жирні кислоти. Ліпази демонструють набагато ширшу субстратну специфічність порівняно з естеразами. Обидва типи ферментів мають регіо-, хемо- та енантіоселективність, а також стабільність в органічних розчинниках. Через це естерази та ліпази широко застосовуються в промислових процесах, що проводяться в органічних розчинниках. Багато гіпер- та термофільних естераз і ліпаз походять від архей, зокрема родів *Pyrococcus*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus*, *Aeropyrum* і *Archaeoglobus*. Такі ферменти також були виявлені в галофільних археях, зокрема родів *Haloarcula* і *Halococcus* (див. таблицю 2.2).

Таблиця 2.2

### Естерази та ліпази гіпер/термофільних архей (Venturini et al., 2022)

Організм	Фермент	Тип ферменту	Властивості ферментів		
			Оптимальна температура (°C)	Оптимальний рН	Термостабільність
<i>Пірокок лютій</i>	Ліпаза	Рекомбінантний	80	7	6 годин, 75 °C
<i>Pyrobaculum</i> sp . 1860 рік	Естераза	Рекомбінантний	80	9	6 годин, 90 °C
<i>Sulfolobus tokodaii</i> , штам 7	Естераза	Рекомбінантний	70	7,5–8,0	40 хв, 85 °C
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Ліпаза	Рекомбінантний	90	10	Не повідомляється

Біотехнологічне застосування естераз і ліпаз. Естерази та ліпази широко використовуються у виробництві тонкої хімії (хімічні речовини з чистотою понад 90%) і фармацевтичній промисловості. Вони застосовуються для покращення розділення численних рацемічних сумішей спиртів і кислот, утворюючи оптично чисті сполуки, такі як ібупрофен, кетопрофен і напроксен. Ці ферменти використовуються також для отримання поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) з рослинних і тваринних ліпідів, а також для виробництва фармацевтичних препаратів (Serwecińska, 2020).

Ліпази застосовуються як добавки до мийних засобів для видалення масел і жирів, що покращує пральну здатність засобів і сприяє видаленню складних

плям, запобігаючи утворенню накипу. У харчовій та кормовій промисловості ліпази використовуються для модифікації структури деяких тригліцеридів, покращуючи смак, фізичні й поживні властивості продуктів. Вони також застосовуються при дозріванні сиру та у виробництві заміників жиру жіночого молока та еквівалентів какао-масла.

У целюлозно-паперовому виробництві ліпази використовуються для видалення гідрофобних компонентів деревини, а також для синтезу нових біополімерних матеріалів, таких як поліефіри та полісахариди, які є біологічно розкладаними та екологічно чистими. Одним із сучасних застосувань є реакції переестерифікації рослинних жирів для виробництва біодизеля (Mancuso, Midiri, Gerace, & Biondo, 2021).

З іншого боку, естерази використовуються в виробництві вина, фруктових соків, пива, алкоголю, а також смакових і ароматичних сполук, присутніх у злаках. В агрохімічній промисловості ці ферменти застосовуються у виробництві пестицидів, інсектицидів і нематоцидів. Ліпази також використовуються в синтезі біополімерних матеріалів, таких як поліефіри та полісахариди, які є біологічно розкладаними і екологічно чистими (Reygaert, 2018).

### **2.3 Глікозилгідролази (ЕС 3.2.1.x)**

Ця велика група ферментів гідролізує глікозидні зв'язки між двома чи більше вуглеводами або між вуглеводними і неуглеводними частинами, розкладаючи складні полісахариди.

Ферменти, що розкладають крохмаль, використовують як субстрат крохмаль — одне з найбільших відновлюваних джерел вуглецю в природі. Крохмаль — гетерогенний полісахарид, що складається з двох полімерів: амілози (15–25 %) і амілопектину (75–85 %), обидва є високомолекулярними компонентами. Амілоза та амілопектин складаються з одиниць  $\alpha$ -D-глюкози, з'єднаних через  $\alpha$ -1,4-глікозидні та  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки відповідно, утворюючи нерозчинний лінійний полімер амілозу та розчинний розгалужений полімер амілопектину (Campion, & Scully, 2018).

Через складну структуру крохмалю його переробка потребує комбінації ферментів, які деполімеризують крохмаль на олігосахариди та менші цукри (ендоглікозидази та екзоглікозидази). Також необхідні ферменти, що трансформують крохмаль шляхом перенесення олігоглюкозидних зв'язків і залишків, утворюючи нові зв'язки (розгалужувальні ферменти та глікозилтрансферази).

Ферменти, що розкладають крохмаль, займають значну частку на світовому ринку ферментів. Сьогодні існує потреба в термостабільних ферментах, оскільки обробка крохмалю часто здійснюється при високих температурах. Крім того, ці ферменти повинні бути незалежними від іонів кальцію та металів для стабілізації та каталітичної активності. Термостабільні ферменти мають переваги в зниженні вартості виробництва цукрових сиропів, оскільки споживають менше енергії (Frieri, Kumar, & Boutin, 2017).

$\alpha$ -Амілази (ЕС 3.2.1.1) довільно розщеплюють  $\alpha$ -1,4-зв'язки на внутрішній частині крохмалю та пов'язаних з ним субстратів, утворюючи розгалужені та лінійні  $\alpha$ -аномерні оліго- та полісахариди різних розмірів. Існують термостабільні  $\alpha$ -амілази рослин, грибів, тварин і мікробів.

Деякі з цих ферментів походять від гіпертермофільних архей, що належать до родів *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Desulfurococcus*, *Staphylothermus*, *Methanococcus* і *Sulfolobus*. Крім того, існують  $\alpha$ -амілази галоалкаліфільних архей, що належать до родів *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Haloferax* і *Natronococcus* (див. Таблицю 2.3).

$\alpha$ -Амілази галоалкаліфільних архей активні при нижчих температурах і вищому рН, ніж  $\alpha$ -амілази гіпер/термофільних архей. З цієї причини вони не підходять для виробництва крохмалю, але можуть бути використані в мийних засобах для прання при середній температурі, оскільки вони стійкі в миючих засобах і органічних розчинниках.

## Ферменти, що розкладають крохмаль з архей (Miethke et al., 2021)

фермент	організм	Тип ферменту	Властивості ферментів		
			Оптимальна температура (°C)	Оптимальний рН	Термостабільність
α-амілаза	<i>Pyrococcus</i> sp. ST04	Рекомбінантний	90–95	5.0	254 хв, 75 °C
	<i>Pyrococcus woesei</i> DSM 3773	Рекомбінантний	95	5.6	3,5 години, 110 °C
	<i>Thermococcus</i> sp.	Рідна	95	5.0	5 годин, 90 °C
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	Рекомбінантний	75–85	5,0–5,5	Не повідомляється
	<i>Methanococcus jannaschii</i>	Рекомбінантний	120	5,0–8,0	50 год, 100 °C
	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	Рідна	70	8.5	2 години, 70 °C
	<i>Галоферакс середземноморський</i>	Рідна	50–60	7,0–8,0	10 годин, 50 °C
β-амілаза	<i>Пірокок лютий</i>	Рідна	110	Не повідомляється	Не повідомляється
Глюкоамілаза	<i>Picrophilus torridus</i>	Рекомбінантний	50	5.0	8 годин, 55 °C
	<i>Сулфолобус solfataricus</i> P2	Рекомбінантний	90	5,5–6,0	Не повідомляється
	<i>Термоплазма ацидофільна</i> DSM 1728	Рекомбінантний	75	5.0	15 хв, 80 °C
α-Глюкозидаза	<i>Пірокок лютий</i>	Рідна	105–115	5,0–6,0	48 годин, 98 °C
	<i>Sulfolobus tokodaii</i> , штам 7	Рекомбінантний	95	4.0	40,1 хв, 100 °C
	<i>Picrophilus torridus</i>	Рекомбінантний	87	5.0	120 хв, 80 °C
	<i>Ferroplasma acidiphilum</i> , штам Y	Рекомбінантний	50	2,4–3,5	190 хв, 50 °C
Пулуланаза II типу	<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD 1	Рекомбінантний	100	5,5–6,0	~ 2 години, 100 °C
	<i>Thermococcus siculi</i>	Рекомбінантний	95	6.0	1 год, 100 °C
	<i>Десульфурокок слизової</i>	Рекомбінантний	85	5.0	50 хв, 85 °C
	<i>Стафілотермус морський</i>	Рекомбінантний	105	5.0	50 хв, 100 °C
	<i>Halorubrum</i> sp. Штам Ha25	Рідна	50	7.5	212 хв, 50 °C
Пулулангідролаза III типу	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Рекомбінантний	95–100	3,5–4,2	45 хв, 100 °C
	<i>Thermococcus aggregans</i> DSM 10597	Рекомбінантний	95	6.5	2,5 години, 100 °C

Закінчення табл.2.3.

Ізомілаза	<i>Sulfolobus solfataricus</i> ATCC 35092	Рекомбінантний	75	5.5	Не повідомляється
Аміломальтаза	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	Рекомбінантний	95	6.7	107 хв, 95 °С
CGTase	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638	Рекомбінантний	95	5.0	46 хв, 95 °С
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	Рекомбінантний	80	5,5–6,0	20 хв, 100 °С
	<i>Галоферакс середземноморський</i>	Рекомбінантний	55	7.5	~ 1 год, 50 °С (3 М NaCl)
Розгалуження-фермент	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	Рекомбінантний	70	7.0	> 120 хв, 90 °С

$\beta$ -Амілази (ЕС 3.2.1.2) атакують кожен альтернативний  $\alpha$ -1,4-глюкозидний зв'язок у крохмалі, утворюючи димерний цукор  $\beta$ -мальтозу. Встановлено, що ці ферменти поширені у вищих рослинах, грибах, бактеріях і лише в одному археоні. Найбільш термостабільною  $\beta$ -амілазою та єдиною з археонів є PF0870, яка походить від *Pyrococcus furiosus* (див. таблицю 2.3). Цей фермент має оптимальну температуру 110 °С, але він не гідролізує крохмаль, глікоген, пулулан або великі мальтоолігосахариди (Renwick, & Mossialos, 2018).

Глюкоамілази ( $\gamma$ -амілази; ЕС 3.2.1.3) є екзогідролазами, які розщеплюють  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки від крохмалю або споріднених полісахаридів, вивільняючи одиниці  $\beta$ -D-глюкози з невідновлюючих кінців. Ці ферменти також гідролізують  $\alpha$ -1,3- і  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки у високомолекулярних полісахаридах. Більшість глюкоамілаз походять від грибів, але вони також присутні у бактерій і термоацидофільних архей, що належать до родів *Picrophilus*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, а також від метаногенного археона *Methanococcus* (див. таблицю 2.3). Ці архейні глюкоамілази більш термостабільні, ніж глюкоамілази бактерій і грибів.

Іншою групою екзогідролаз є  $\alpha$ -глюкозидази (ЕС 3.2.1.20), які розривають кожен  $\alpha$ -1,4-глікозидний зв'язок від кінцевого невідновного кінця крохмалю або менших полісахаридів, що утворюються іншими ферментами, що розкладають крохмаль. Вони віддають перевагу меншим олігосахаридам, таким як мальтотріоза, і генерують глюкозу. Ці ферменти беруть участь в останньому етапі розкладання крохмалю. Більшість з них походять від бактерій і

гіпертермофільних архей, що належать до родів *Pyrococcus* і *Thermococcus*. Крім того, є  $\alpha$ -глюкозидази з термоацидофільних архей *Sulfolobus* і *Picrophilus*, а також з ацидофільного архея *Ferroplasma acidophilum* штам Y (див. таблицю 2.3) (Årdal et al., 2020).

Ферменти, що розгалужують крохмаль, є важливими через їх біотехнологічне застосування. Вони гідролізують  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки в амілопектині, глікогені та споріднених полісахаридах.

Пулуланази розщеплюють пулулан — полісахарид, який виробляється з крохмалю грибом *Aureobasidium pullulans*. Ця молекула є лінійним  $\alpha$ -глюканом, що складається з одиниць мальтотріози, з'єднаних  $\alpha$ -1,6-глікозидними зв'язками. Пулуланази здатні гідролізувати  $\alpha$ -1,6-глюкозидні зв'язки в пулулані та інших розгалужених полісахаридах, таких як крохмаль. Оскільки повний гідроліз крохмалю може бути досягнутий лише в присутності ферментів, що розгалужуються, пулуланази представляють великий інтерес для крохмальної промисловості.

На підставі субстратної специфічності та продуктів реакції ці ферменти поділяють на три групи:

Пулуланази типу I — гідролізують виключно  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки пулулану. Вони продукуються *K. pneumoniae*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacillus sp. KSM-1876*, *T. aquaticus*, лужнофільними *Bacillus sp. S1*, *Micrococcus sp. Y-1*.

Пулуланази типу II (амілопуллуланази, EC 3.2.1.41) — гідролізують  $\alpha$ -1,6-зв'язки в пулулані, утворюючи мальтотріозу, а також гідролізують  $\alpha$ -1,4-зв'язки в лінійних і розгалужених олігосахаридах, таких як амілоза та амілопектин. Амілопуллуланази здатні перетворювати полісахариди, такі як амілопектин, на малі цукри (наприклад, глюкозу, мальтозу). Ці ферменти важливі для крохмалопереробної промисловості завдяки їх специфічній здатності до розгалуження. Вони були виявлені в бактеріях і гіпер/термофільних археях, що належать до родів *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Desulfurococcus*, *Staphylothermus* і в галофільному археоні *Halorubrum*.

Пулулангідролаза типу III (EC 3.2.1.x) — атакує як  $\alpha$ -1,4-, так і  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки в пулулані, утворюючи суміш мальтотріози, панози та мальтози. Цей фермент також розкладає крохмаль, утворюючи головним чином мальтотріозу та мальтозу. Він був виявлений у гіпертермофільних археях родів *Thermococcus*.

Ізомілази (EC 3.2.1.68) — це ферменти, які гідролізують  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки в розгалужених полісахаридах, таких як амілопектин, глікоген та  $\alpha$ - і  $\beta$ -лімітні декстрини, утворюючи лінійні мальтоолігосахариди. Ізомілази є єдиними ферментами, здатними повністю розгалужувати глікоген. Вони були виявлені в рослинах, бактеріях і в археоні *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35,092.

Трансферази — це ферменти, які розривають  $\alpha$ -1,4-глюкозидний зв'язок донорної молекули і переносять частину цієї молекули на глюкозидний акцептор, утворюючи новий глюкозидний зв'язок. Аміломальтази (EC 2.4.1.25) каталізують перенесення сегмента  $\alpha$ -1,4- d -глюкану до відновного кінця акцептора (глюкози або іншого  $\alpha$ -1,4- d -глюкану). Ці ферменти використовуються для виробництва сиропів. Аміломальтази були виявлені в бактеріях і гіпертермофільних археях, що належать до родів *Sulfolobus*, *Thermococcus* і *Pyrobaculum*.

Циклодекстринглікозилтрансферази (CGTases; EC 2.4.1.19) перетворюють крохмаль і олігодекстрини в циклодекстрини, які являють собою 6-8  $\alpha$ -1,4-зв'язаних одиниць глюкози з неполярною внутрішньою порожниною. Більшість цих ферментів виявлено в бактеріях, а також у гіпертермофільних археях, що належать до родів *Pyrococcus*, *Thermococcus*, а також у штамі *Archaeoglobus fulgidus* 7324 і галоалкаліфільних археонах *Haloferax mediterranei*.

Ферменти розгалуження ( $\alpha$ -1,4-глюкан 6- $\alpha$ -глікозилтрансфераза; EC 2.4.1.18) розщеплюють  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки лінійного оліго- або полісахариду та передають розгалуження на той самий або інший полісахарид, створюючи новий  $\alpha$ -1,6 глюкозидний зв'язок. Ці ферменти були виявлені в рослинах, ссавцях, бактеріях, грибах і в археоні *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (Вах, & Green, 2015).

У харчовій та комбікормовій промисловості крохмалеперетворювальні ферменти використовують для отримання з крохмалю цінних продуктів, таких як глюкоза, фруктоза та мальтоза. Ці ферменти дозволяють виробляти матеріали на основі крохмалю з желатиноподібними характеристиками, а також визначеними лінійними декстринами, що використовуються як текстури, стабілізатори аромату та пребіотики.

Пулуланизи та амілопуллуланизи застосовуються для виробництва глюкози, мальтози та фруктози як харчових підсолоджувачів. Вони також використовуються для виготовлення сиропів з високим вмістом глюкози, фруктози та мальтози, що є основними компонентами для виробництва високоякісних цукерок і морозива. У хлібопекарській промисловості пуллуланизи застосовуються для поліпшення текстури, об'єму та смаку хлібобулочних виробів.

Аміломальтази можуть виробляти циклоамілозу та термооборотний крохмальний гель, який використовується як замітник желатину. Вони також застосовуються для отримання сиропів ізомальтоолігосахаридів з низькою солодкістю та в'язкістю.  $\alpha$ -амілази, ферменти розгалуження та  $\beta$ -амілази можуть діяти як агенти, що запобігають черствінню, зменшуючи небажані зміни в хлібі.

У фармацевтичній промисловості та галузі здоров'я людини пуллуланизи використовуються для виробництва мальтози, яка може бути заміником d-глюкози при внутрішньовенному харчуванні. Ці ферменти також використовуються для виробництва розгалужених циклодекстринів, які завдяки своїй неполярній внутрішній частині можуть служити хостами для фармацевтично важливих молекул, наприклад, білків, що дозволяє їх солюбілізувати та стабілізувати.

Розгалуження пуллуланиз також застосовуються для отримання повільно засвоюваного крохмалю, що корелює з низьким рівнем глікемії. Лужні пуллуланизи та  $\alpha$ -амілази використовуються як добавки до засобів для миття посуду та прання для видалення крохмалю в лужних умовах.

У виробництві біопалива  $\alpha$ -амілази, глюкоамілази, пуллуланизи та

амілопуллуланизи застосовуються для руйнування крохмалевмісних культур (наприклад, пшениці, кукурудзи, ячменю) і виробництва етанолу .

## 2.4 Ферменти, що переробляють ДНК

ДНК-полімерази та ДНК-лігази є важливими ферментами, широко застосовуваними в молекулярній біології для виконання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та аналітичних методів відповідно.

ДНК-полімерази (ЕС 2.7.7.7) — це ключові ферменти реплікації ДНК у всіх формах життя. Вони синтезують новий ланцюг ДНК, використовуючи матричну ДНК, додаючи дезоксирибонуклеотид 5'-трифосфат на зростаючий 3'-ОН кінець праймерного ланцюга в присутності іонів  $Mg^{2+}$ .

Тaq-полімераза була першою термостабільною ДНК-полімеразою, використаною в ПЛР. Однак вона не має 3'–5' коректурної екзонуклеазної активності, що призводить до її нездатності вирізати невідповідності. Отже, для досягнення високої точності та зменшення частоти помилок найкращим вибором є архейна ДНК-полімераза. Ці полімерази мають 3'–5' коректурну активність, що дозволяє знижувати частоту помилок у десять разів порівняно з Таq-полімеразою. Вони також є більш термостабільними, але мають повільнішу швидкість синтезу. Найпоширенішими архейними ДНК-полімеразами є ті, що належать до родів *Pyrococcus* (Pfu, Pwo, Deep Vent™, Platinum® Pfx) та *Thermococcus* (KOD1, Tli, 9°N-7) більш структурованою та зрозумілою. (див. Таблиця 2.4).

Таблиця 2.4

### ДНК-полімерази з архей (Ghosh, Sarkar, Issa, & Haldar, 2019)

ДНК-полімерази	організм	Період напіввиведення
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	95% активності через 1 годину, 95 °C
Deep Vent™	<i>Pyrococcus species GB-D</i>	23 години, 95 °C
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>	2 години, 100 °C
Pab (Isis™)	<i>Pyrococcus abyssi</i>	5 годин, 100 °C
Tli (Vent™)	<i>Thermococcus litoralis</i>	6,7 год, 95 °C

KOD1	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	12 год, 95 °С/3 год, 100 °С
Tfu	<i>Thermococcus fumiculans</i>	3,3 години, 95 °С/2 години, 100 °С
TNA1_pol	<i>Thermococcus</i> sp. NA1	12,5 год, 95 °С/3,5 год, 100 °С

З іншого боку, ДНК-лігази (АТФ-залежні ДНК-лігази, ЕС 6.5.1.1, і NAD<sup>+</sup>-залежні ДНК-лігази, ЕС 6.5.1.2) є універсальними ферментами, які з'єднують розриви в молекулах ДНК. Перша термостабільна ДНК-лігаза була виявлена в бактерії *Thermus thermophilus* HB8. Більшість таких ферментів походять від термофільних бактерій, але вони також зустрічаються в гіпертермофільних і термофільних археях, таких як *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Hyperthermus butylicus*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Sulfophobococcus zilligii*, *Aeropyrum pernix* K1, *Archaeoglobus fulgidus* і *Sulfolobus* (див. таблицю 2.5). На відміну від бактеріальних ДНК-лігаз, ці ферменти потребують АТФ як кофактора.

Таблиця 2.5

### ДНК-лігази з архей (Streicher, 2021)

Організм	Період напіввиведення
<i>Pyrococcus abyssi</i>	60 хв, 90 °С
<i>Thermococcus fumiculans</i>	3 години, 80 °С
<i>Hyperthermus butylicus</i>	2,3 години, 94 °С/1,7 години, 99 °С
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	20 хв, 90 °С
<i>Aeropyrum pernix</i> K1	25 хв, 110 °С

ДНК-полімерази і ДНК-лігази є важливими інструментами в молекулярній біології. Термостабільні ДНК-полімерази широко використовуються для ампліфікації ДНК, секвенування та мічення. Завдяки високій точності ДНК-полімераз архей ці ферменти є ключовими для зменшення помилок під час ампліфікації в продуктах ПЛР. З іншого боку, термостабільні ДНК-лігази використовуються при конструюванні праймерів для секвенування та як ферменти для реакцій LDR/LCR, де вони сприяють каталітичному

з'єднанню нїк-зв'язків при високих температурах (90–100 °C). Техніки LDR (ligation detection reaction) та LCR (ligase chain reaction) застосовуються для виявлення одноосновних мутацій в ланцюгах ДНК, що робить їх корисними для діагностики генетичних захворювань (Ventola, 2015).

## РОЗДІЛ 3

### ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ АРХЕЙ

#### 3.1 Інноваційні процеси бродіння для виробництва біомаси архей, ферментів і метаболітів

Основним обмеженням для промислового застосування архейних ферментів та метаболітів є низька продуктивність процесів бродіння, зумовлена повільним темпом росту та низьким виходом біомаси. Для подолання цих обмежень фокус зосереджений на вивченні фізіології архей, що мають біотехнологічний потенціал, а також на розробці біореакторів і біопроцесів, які підвищують продуктивність. Через специфічні умови навколишнього середовища, необхідні для вирощування екстремофілів, проблеми забруднення мінімальні, тому підхід безперервної культури став широко застосовуваним (Domingo-Calap, & Delgado-Martínez, 2018).

Безперервні експерименти з культурами дозволяють краще зрозуміти важливість конкретних ферментів, а також реакції на стрес та незвичайні фізіологічні характеристики гіпертермофільних і надзвичайно термоацидофільних мікроорганізмів. Щоб підвищити вихід біомаси гіпертермофільного археона *Pyrococcus furiosus*, Raven та ін. використали безперервні культури за певних мінімальних умов, досягнувши максимальної щільності клітин  $10^8$  клітин/мл при вирощуванні на крохмалі. Рінкер та ін. культивували гіпертермофільні гетеротрофи *Metallosphaera sedula*, *P. furiosus* і *Thermococcus litoralis* в хемостаті, спостерігаючи продукування екзополісахаридів. Безперервне культивування *Methanobacterium thermoautotrophicum* проводили з різними швидкостями газоутворення, використовуючи безперервні вимірювання фактора, що обмежує ріст ( $H_2$ ), і була розроблена та перевірена проста неструктурована математична модель (Schill et

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шаульський В.О.			РОЗДІЛ 3 ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ АРХЕЙ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					37	123
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

al.). Інший надзвичайно термофільний метаноген, *Methanococcus jannaschii*, був вирощений у безперервній культурі для оцінки кореляції між активністю гідрогенази та такими параметрами, як швидкість росту та тиск (Tsao et al.). Оптимізація середовища вирощування є ключовим фактором для підвищення продуктивності екстремофільної біомаси, що використовується в промисловості (Lin, Koskella, & Lin, 2017).

Особливий інтерес був зосереджений на культивуванні анаеробних архей, оскільки їх чутливість до кисню є однією з основних перешкод для культивування та розвитку систем генетичного обміну в архей. Роте та Томм повідомили про заміну  $\text{Na}_2\text{S}$  на  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  для захисту культур від кисню навіть поза анаеробною камерою, що значно спростило метод культивування. Годфруа та ін. використовували газліфтний біореактор для безперервної культури *Pyrococcus abyssi* ST549 на вуглеводах, білкових субстратах або амінокислотах. Вони виявили, що дисахариди, такі як мальтоза та целобіоза, не підтримують ріст, тоді як білкові матеріали, зокрема пептон або амінокислоти в присутності сірки, стали хорошими субстратами.

Використання відходів як субстратів для виробництва екстремофільної біомаси є привабливим варіантом для отримання ферментів та метаболітів, що можуть використовуватись у комерційних цілях. *Sulfolobus solfataricus* MT4, вирощений при  $87^\circ\text{C}$  у 100-літровому ферментері на сироватці, отриманій безпосередньо з молочних ферм, дав 80 г сухої біомаси на моль лактози (Romano et al.).

Дослідження також зосереджуються на розробці методів культивування, що забезпечують високу щільність клітин. На сьогоднішній день успішні підходи до покращення виходу біомаси та виробництва ферментів чи метаболітів включають або періодичне живлення культур, або розробку спеціальних біореакторів, які дозволяють ефективно видаляти токсичні метаболіти і замінювати поживні речовини. Зокрема, ефективне виробництво *Sulfolobus solfataricus* DSM 1617 було досягнуто за допомогою методу періодичного підживлення (Park and Lee). У цих дослідженнях максимальний вихід клітин

(сухої біомаси) становив 23 г/л при постійному об'ємі, підтримуваному безперервною заміною води, що випарувалася. Також було оцінено кінетичні параметри та математичну модель процесу бродіння, а також вивчено вплив дріжджового екстракту та інших комплексних компонентів на утворення метаболітів (наприклад, аміаку) і вихід клітин (Green et al., 2023).

Новий стійкий до корозії біореактор, виготовлений з поліефіретерокетону, технічного скла (боросилікатного скла), кераміки на основі нітрату кремнію та кераміки з нітриту кремнію, був використаний для культивування двох нещодавно виділених екстремальних галофільних архей, які виробляють полі- $\gamma$ -глутамінову кислоту та полі- $\beta$ -гідроксималяну кислоту відповідно (Nezayen et al.). Періодична ферментація на *n*- масляній кислоті як джерелі вуглецю дала щільність клітин (суха біомаса) 2,3 г/л, при цьому накопичення полі- $\beta$ -гідроксималяної кислоти досягло 53% сухої біомаси.

Хоча застосування методів періодичного підживлення в поєднанні з оптимізацією середовища сприяло культивуванню архей у достатніх кількостях для фізіологічних досліджень та виділення численних ферментів, що мають промислове значення, ці методи не були достатньо ефективними для великомасштабного виробництва. Щоб подолати це обмеження, кілька дослідницьких груп зосередилися на проектуванні біореакторів, що поєднують процес бродіння з процесами мембранного розділення, таким чином усуваючи проблеми, пов'язані з токсичністю накопичених метаболітів. Новий біореактор для діалізу був спроектований і розроблений у Технічному університеті Гамбурга і використовувався для вивчення впливу таких параметрів, як швидкість газоутворення, додавання субстрату та перемішування, на швидкість росту *Pyrococcus woesei* (Rüdiger et al.). Krahe та ін. використовували процес діалізу для отримання високої щільності клітин трьох термофільних штамів, два з яких належать до домену *Archaea*. У результаті культивування *Sulfolobus shibatae* було досягнуто кінцевої щільності клітин (сухої біомаси) 110 г/л за 350 годин, тоді як культивування *Pyrococcus furiosus* дало максимальну щільність

клітин  $3 \times 10^{10}$  клітин/мл, що є 20-кратним збільшенням порівняно з періодичним процесом (Pires et al., 2020).

Ми використали нову техніку мікрофільтрації (MF) для високощільного культивування термоацидофільних архей. Біореактор MF складався з традиційної ферментаційної ємності, модифікованої за рахунок вставки двох модулів MF, виготовлених із поліпропіленових капілярів. Щоб подовжити фазу росту мікроорганізмів, процес бродіння був розділений на три послідовні фази: періодичну, періодичну з підживленням і MF. Біореактор використовувався протягом понад 100 запусків за більше ніж рік без втрати фільтраційної здатності. Ми отримали високі врожаї *S. solfataricus* G θ, що відповідають 15-кратному збільшенню біомаси (максимальна суха біомаса клітин 38 г/л) порівняно з серійною культурою. Клітини підтримували активний синтез репортерних ферментів, що мають промисловий інтерес, включаючи α-глюкозидазу, β-глікозидазу та алкогольдегідрогеназу (Schiraldi et al.). Хоча ми отримали покращений вихід біомаси з біореактором MF, виробництво цікавих ферментів було низьким через тривалий час подвоєння ( $t_d$ ), який для *Sulfolobus* коливається від 7 до 18 годин, а також через низькі рівні експресії цих ферментів. Найбільш перспективним підходом до подолання цих обмежень може бути поєднання методів бродіння з методами молекулярної біології (Caflisch, Suh, & Patel, 2019).

### **3.2 Стратегії клонування та експресії архейних ферментів та їх промислове використання**

Оскільки ферменти архей адаптовані до екстремальних умов, вони є надзвичайно стабільними. Тому вони ідеально підходять для застосування в промислових процесах, що виконуються в суворих умовах, таких як високі температури, наявність органічних розчинників або висока іонна сила. З тих самих причин вони також є ідеальними модельними молекулами для досліджень, спрямованих на вивчення механізмів хіміко-фізичної стабільності білків. Біологи вже використовують екстремофільний фермент Taq полімерази з *Thermus aquaticus*. Окрім виділення нових ферментів, спектр доступних

ферментних можливостей можна розширити за допомогою випадкового мутагенезу та спрямованої еволюції (Torres-Barceló, 2).

Гени, що кодують кілька ферментів екстремофілів, були клоновані в мезофільних господарях з метою надмірного виробництва ферменту та зміни його властивостей відповідно до комерційних застосувань (див. огляд Ciaramella та ін.). *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* та дріжджі успішно використовувалися як мезофільні господарі для кількох генів архей (Cannio et al.).

Система експресії має бути обрана на основі передбачуваного використання експресованого білка. Для отримання достатньої кількості рекомбінантного ферменту для базової характеристики рекомендується експресія в *E. coli*, оскільки цей господар легко вирощувати в лабораторії, а вектори добре охарактеризовані. Експресія в дріжджах має переваги для великомасштабного промислового виробництва. Крім того, оскільки дріжджі є «загалом визнаними безпечними» організмами, вони представляють собою ідеальну пілотну систему для виробництва ферментів для харчової промисловості (Jończyk-Matysiak et al., 2019).

Рекомбінантні ферменти можна отримати шляхом клонування та експресії синтетичного гена. Fusí та ін. повідомили про експресію P2 рибонуклеази з *S. solfataricus*, де кодон гена був модифікований для включення триплетів, які широко використовуються в клітинах *E. coli* для посилення експресії білка. Цю модифікацію досягнуто шляхом зворотної трансляції амінокислотної послідовності в вироджену нуклеотидну послідовність та синтезу через ПЛР-ампліфікацію праймерів, що перекриваються.

Щоб подолати обмеження, пов'язані з використанням різних кодонів для гетерологічної експресії архейних ферментів, Purcareea et al. успішно клонували та експресували в *E. coli* синтетазу карбамоїлфосфатази (CPSase) з *Pyrococcus abyssi*. Надекспресія гена CPSase була досягнута шляхом котрансформації клітин-господарів плазмідною, що кодує тРНК-синтетазу для низькочастотних кодонів *E. coli*. Ішіда та ін. змогли отримати ефективне виробництво

термофільної 3-ізопропілмалатдегідрогенази з GC-багатим кодуєчим геном в *E. coli* шляхом забезпечення відкритої рамки зчитування лідера.

Де Паскаль та ін. клонували та експресували в *E. coli* (Rb791) гени, що кодують трегалозилдекстриноутворюючий фермент (TDFE) і трегалозоутворюючий фермент (TFE) *S. solfataricus* MT4. Нещодавно De Pascale et al. злили кодуєчі послідовності TFE і TDFE, щоб отримати новий химерний білок, який перетворює декстрини на трегалозу при високій температурі (75 °C) за допомогою послідовних ферментативних етапів. Злиття генів було проведене так, що С-кінець TFE, модифікований заміною стоп-кодону на залишок Gly, знаходився в рамці з N-кінцем TDFE. Лінкер був розроблений для сприяння конструюванню рекомбінантної ДНК без видалення амінокислот будь-якої білкової частини, що призводить до вставки чотирьох амінокислот Ser-Gly-Ser-Gly .

Щоб полегшити біохімічну характеристику незвичайних архейних ферментів, виробництво можна збільшити, використовуючи екстремофільні мікроорганізми як господарів для експресії аутологічних генів (Gardner and Whitman). Для видів *Methanococcus* були розроблені інтегративні та човникові вектори для надмірної експресії специфічних ферментів зі складними простетичними групами, які неактивні, якщо експресуються в *E. coli* (Gardner and Whitman). Вони також були протестовані як господарі для гетерологічних білків, таких як  $\beta$ -галактозидаза з *E. coli*.

Добре охарактеризована модель *E. coli* значно полегшила розробку молекулярно-генетичних методів, таких як генетичні маркери та перенесення генів, у галофільних представників *Archaea* (Holmes and Dyall-Smith, Holmes et al.). Виявлення того, що *Halomonas meridiana* та *H. elongata* можуть секретувати термостабільну  $\alpha$ -амілазу з *Bacillus licheniformis*, вказує на те, що представники роду *Halomonas* можуть бути хорошими кандидатами як клітинні фабрики для виробництва гетерологічних позаклітинних ферментів (Coronado et al., Frillings et al.). Молекулярні інструменти для термофільних архей все ще розробляються,

оскільки деякі інструменти, створені для бактеріальних систем, не функціонують в архейних системах (*Keeling et al., Keeling and Doolittle*).

Генетичні елементи, такі як віруси та плазміди, є потужними інструментами для вивчення молекулярної генетики архей. Крім того, нові вектори експресії можна отримати шляхом маніпулювання існуючими елементами. Одними з найбільш цікавих є генетичні системи, які працюють у багатьох мікроорганізмах. Канніо та ін. сконструювали човниковий вектор рEXSs на основі природного вірусу *Sulfolobus shibatae* та плазміди *E. coli*. Ця плазміда здатна трансформуватися і стабільно підтримуватися як у *S. solfataricus*, так і в *E. coli*, оскільки містить послідовність автономної реплікації вірусу SSV1 (ARS) (Palm et al.), а також послідовність плазміди рGEM5Zf(-) з *E. coli* і маркер гена стійкості до антибіотиків для *S. solfataricus*, отриманий шляхом відбору мутанта гена гігроміцинфосфотрансферази з *E. coli* (Gritz and Davies). Ця ж група також досліджувала доцільність використання *S. solfataricus* як господаря для мезофільного білка гігроміцин В фосфотрансферази (hph) з *E. coli*. Білок hph було виділено за допомогою спрямованої еволюції при 75 °С, використовуючи бібліотеку випадкових мутантних версій гена hph (Cannio et al.). Використання човникового вектора рEXSs дозволило вибрати мутантну версію гена hph, що містила дві точкові мутації, але залишалася правильно складеною та функціональною, як білок дикого типу. Крім того, цей конструкт був дуже стабільним у більш термофільних штамів при температурах від 75 до 82 °С і, отже, очікується, що він буде хорошим кандидатом на роль генетичного маркера при ще вищих температурах після подальшої термоадаптації (Cannio et al.).

Інший вектор (рKMSD48), що містить як SSV1, так і ДНК рBluescript, є повністю стабільним як у *E. coli*, так і в *S. solfataricus* (Stedman et al.). На відміну від інших човникових векторів, рKMSD48 стабільний у *E. coli* навіть при високій кількості копій. Крім того, оскільки його промотор можна контролювати за допомогою УФ-опромінення, цей вектор можна використовувати для надекспресії *in vivo* генів у *S. solfataricus* (Stedman et al.). Хоча ці нові інструменти генної інженерії можуть не мати прямого промислового

застосування, вони відіграватимуть центральну роль у розробці методів великомасштабного виробництва архейних ферментів із потенційним застосуванням у промисловості.

Метод, обраний для експресії екстремофільного ферменту, має враховувати наступні процеси, які використовуються для очищення ферменту. Основні висновки досліджень клонування та експресії архейних ферментів можна підсумувати так: (1) Археї використовують універсальний генетичний код, і їхні гени транскрибуються як еукаріотами, так і бактеріями. (2) Експресійний продукт зберігає свої природні властивості, включаючи термофільність і термостабільність. (3) Жорстка структура термофільних білків при низьких температурах запобігає їх деградації протеазами господаря, що сприяє накопиченню рекомбінантного ферменту. Рекомбінантні ферменти екстремофілів, як правило, неактивні за оптимальних умов росту господаря, і різницю в спостережуваній біомасі між різними рекомбінантами можна пояснити специфічним втручанням у цикл реплікації господаря, яке здійснюється експресованим гетерологічним геном. (4) Термостабільні ферменти можна легко очистити від мезофільних білкових забруднювачів за допомогою послідовних стадій термічного осадження. Після термічної денатурації залишається лише ферментативна активність експресованого термофільного білка, який зазвичай має достатню чистоту для промислового застосування (Rossi and De Rosa, Schiraldi et al.) (Thompson, Casjens, Sharma, & Grose, 2019).

Методи генної інженерії є цінними інструментами для створення нових біокатализаторів, які можуть покращити біопроцеси та полегшити реалізацію інноваційних біотрансформацій. Молекулярна біологія має потенціал для подолання обмежень щодо доступності ферментів і для розробки нових біокатализаторів, специфічних для конкретних промислових застосувань. Ми запропонували кілька варіантів промислового використання рекомбінантних архейних ферментів. Нове промислове використання природних і

рекомбінантних архейних ферментів буде залежати від поєднання генетичних стратегій та конструкції біореакторів.

### **3.3 Промисловий потенціал архейних ферментів і метаболітів**

Більшість архейних біопродуктів і біопроцесів, розроблених у промисловості, базуються на нетрадиційних властивостях архейних біомас, їхніх ферментів і метаболітів. У цій статті ми описуємо кілька багатообіцяючих програм, які були розроблені за останнє десятиліття, та висвітлюємо програми, що вже вийшли на ринок.

#### **Біотехнологічне застосування архейних біомас**

Незважаючи на великий потенціал мікроорганізмів з домену Archaea, їх промислове застосування було обмежене, здебільшого процесами обробки мікробіологічних відходів (Kandler and Zillig). Біологічний метаногенез активно використовується для анаеробної обробки осаду стічних вод, а також сільськогосподарських, муніципальних і промислових відходів, де підтримка бажаної метаногенної флори досягається інокуляцією. Метаногени — це таксономічно та філогенетично різноманітна група мікроорганізмів, які отримують енергію для росту в результаті реакції, що призводить до утворення метану. Вони використовують лише невелику кількість сполук, таких як  $H_2$  або сполуки з одним атомом вуглецю, що робить їх залежними від інших організмів для постачання субстратів у більшості анаеробних середовищ (Voone et al.).

Для підвищення ефективності анаеробного зброджування було розроблено багато різних конфігурацій біореакторів, таких як обертовий біологічний контактор, анаеробний перегородковий реактор і висхідний анаеробний реактор з мулом, і кілька великих установок працюють на цих принципах (Rehm et al.). Нещодавно метаногенний процес був відтворений на лабораторному масштабі для анаеробного зброджування органічної фракції міських сірих відходів за допомогою змішаної популяції архей; реактори подавалися щодня і підтримувалися в стаціонарному стані більше 2 років (Scherer et al.). Ці приклади демонструють потенціал поєднання процесів

обробки відходів з виробництвом біогазу, відновлюючи енергію з неминучого процесу (Khan, & Nilsson, 2015).

Галофільні археї були оцінені для біоремедіації в суворих умовах, деградації органічних забруднювачів і обробки концентрованих текстильних стічних вод, зокрема розчинів перших фарбувальних розчинів з процесу фарбування, які містять високий вміст солі (Margesin and Schinner). Галофільні бактерії, що виробляють біоповерхнево-активні речовини, можуть відігравати значну роль у прискореній рекультивації забруднених нафтою соляних середовищ. Банат та ін. отримали обнадійливі результати щодо контролю забруднення вуглеводнями на морських ділянках, які представляють собою самодостатні системи. Lovley досліджував розкладання вуглеводнів архейними мікробами в безкисневих умовах. Сульфатвідновлюючі мікроорганізми, що належать до домену *Archaea*, були виділені через їх здатність анаеробно розщеплювати алкани. Повідомлялося про анаеробне окислення метану сульфатом як акцептором електронів у водних відкладеннях, яке, як припускають, включає зміну метаногенезу, який каталізують археї, з поглинанням метаболітів, що переносять електрони, сульфатвідновлювальними бактеріями (Spormann and Widdel).

Оскільки застосування ацидофілів у переробці мінералів у біореакторах нещодавно було розглянуто Norris et al., тут воно буде згадано лише коротко. Кілька промислових застосувань *Crenarcheota* пов'язані з їхнім унікальним метаболізмом сірки. Різноманіття мінеральних сульфід-окислюючих термофільних архей було виділено як із природного, так і промислового середовища. Ці мікроорганізми привернули увагу завдяки своєму потенціалу у вилученні металів із сульфідних руд, які не піддаються розчиненню (Norris) .

Порівняння окислення халькопіриту мезофілами, термофілами та термоацидофільними археями показало, що ефективність вилучення зростала пропорційно до підвищення температури до 80 °C (Horric і Оуен). *Sulfolobus metallicus* використовувався для біовидобутку корисних копалин: у пілотному біореакторі він витримував концентрацію міді 40 г/л (Horric та ін.).

Заслуговує на увагу поділ термоацидофілів на основні філогенетичні групи, що відображає різноманітний потенціал штамів для ефективного окислення мінеральних сульфідів. До унікальних характеристик метаболізму сірки архей також належить застосування *P. furiosus* у переробці шинної гуми шляхом десульфурації та подальшої вулканізації, про що повідомляють *Bredberg et al.* Вилужену етанолом кріоподрібнену шинну гуму, оброблену *P. furiosus* протягом 10 днів, вулканізували разом із первинною гумою, що призвело до отримання продукту з хорошими механічними властивостями.

На додаток до потенційного використання архейної біомаси, природні та модифіковані архейні ферменти представляють значні можливості для промислового застосування. Біотехнологічна цінність цих ферментів пов'язана не лише з їхнім безпосереднім використанням, а й зі знаннями, отриманими завдяки молекулярним послідовностям і кристалографічним дослідженням. Такі знання дозволяють модифікувати звичайні ферменти для використання як біокатализатори в суворих промислових умовах.

Широке використання ДНК-полімераз із гіпертермофільних архей може передвіщати майбутнє загального використання екстремофільних ферментів у біотехнології. Однак жоден із нових ферментів цих мікроорганізмів ще не отримав значного промислового застосування через труднощі, що виникають при їх великомасштабному виробництві. Очікується, що найближчим часом будуть зроблені зусилля для вирішення або полегшення цих труднощів (Cowan).

Багато архейних ферментів, що беруть участь у метаболізмі вуглеводів, особливо з сімейства глікозилгідролаз, становлять особливий інтерес для промислової біотехнології. Крахмалопереробна промисловість, яка перетворює крохмаль у більш цінні продукти, такі як декстрини, глюкоза, фруктоза та трегалоза, може отримати переваги від використання термостабільних ферментів.

У процесах обробки крохмалю потрібні високі температури, щоб розділити крохмаль і зробити його доступним для ферментативної дії. Нині використовуються ферменти з мезофільних організмів, але очікується, що це

зміниться найближчим часом завдяки застосуванню амілаз, пуллуланаз і  $\alpha$ -глюкозидаз, нещодавно виділених із гіпертермофільних джерел (Sunna et al., Ді Лернія та ін., Бертольдо та ін.) (Bagińska et al., 2023).

Подібним чином,  $\alpha$ -амілаза, що виробляється позаклітинно галогенотолерантним археомом *Natronococcus sp.* штам Ah-36, має перспективи для промислового використання. Цей фермент проявляє максимальну активність при 55 °С, рН 8,7 і 2,5 М NaCl, гідролізуючи розчинний крохмаль, амілозу, амілопектин, а також глікоген, утворюючи переважно мальтотріозу, з невеликою кількістю глюкози та мальтози як побічних продуктів (Kobayashi et al.).

Більшість пуллуланаз архей належить до ферментів типу II: вони розщеплюють глікозидний зв'язок  $\alpha$ -1,6 у пулулані, утворюючи мальтотріозу, або зв'язок  $\alpha$ -1,4, утворюючи панозу та ізопанозу. Проте ці ферменти зазвичай інгібуються циклодекстринами. Водночас археальна пуллулاناза типу II з широкою субстратною специфічністю нещодавно була виявлена у сирих клітинних екстрактах *Desulfurococcus mucosus* і успішно клонована в *Bacillus subtilis* (Duffner et al.).

Відкриття цього термостабільного ферменту (максимальна активність при 85 °С) може значно покращити процес біоконверсії крохмалю на етапі оцукрювання.

Ще одне багатообіцяюче застосування гіпертермофільних архейних ферментів — виробництво трегалози. Трегалоза, невідновлюючий  $\alpha$ -1,1-диглюкозилдисахарид, стабілізує ферменти, антитіла, вакцини та гормони. Вона також має широкий спектр застосувань у харчових продуктах як консервант і утримувач вологи (Arguelles, Гуо та ін.).

Нині виробництво трегалози здійснюється при 45 °С шляхом послідовної дії двох ферментів мезофільної бактерії *Arthrobacter sp.* Q36. Перший фермент, трегалозилдекстринутворюючий, перетворює декстрин у трегалозилдекстрин, а другий, трегалозилутворюючий, перетворює трегалозилдекстрин у трегалозу та низькомолекулярні декстрини. Ця поперемінна дія забезпечує повне перетворення декстринів на трегалозу.

Використання термофільних ферментів у цьому процесі може усунути проблеми, пов'язані з в'язкістю та стерильністю. Біосинтетичний шлях трегалози було знайдено серед ферментативної спадщини архей *Sulfolobales* (Kobayashi et al., Di Lernia et al.). Ці ферменти були клоновані та експресовані з високим виходом у *E. coli* Rb-791 (De Pascale et al.), а рекомбінантні штами вирощувалися при високій щільності у мікрофільтраційному біореакторі (Schiraldi et al.).

Для перевірки придатності цих біокаталізаторів у промислових умовах було зібрано проточний реактор, що містив рекомбінантні клітини *E. coli* з необхідною ферментативною активністю. У безперервній системі вдалося успішно отримати трегалозу з декстринів при 75 °C із кінцевою конверсією 90% (Di Lernia et al.).

Інший перспективний фермент, цикломальтодекстринглюканотрансфераза, був нещодавно виділений із гіпертермофільного археона *Thermococcus sp.* (Tachibana et al.). Цей фермент демонструє оптимальну активність розкладання крохмалю та синтезу циклодекстрину при температурах вище 90 °C, що сприяє зниженню в'язкості та ризику забруднення.

Лужна цикломальтодекстринглюканотрансфераза вже активно використовується у промисловому виробництві циклодекстринів. Вона знижує витрати на виробництво та сприяє широкому застосуванню циклодекстринів у харчових продуктах, хімічній та фармацевтичній промисловості (Horikoshi).

Розкладання целюлози до її мономеру, глюкози, може бути досягнуто завдяки синергічній дії трьох ферментів: ендоглюканаза, екзоглюканаза і  $\beta$ -глюкозидаза. Останні два ферменти були виділені, очищені та клоновані з кількох видів *Sulfolobales* (Cubellis та ін., Grogan, Moracci та ін., Nucci та ін.), а також з *Pyrococcus furiosus* (celB) (Voorhorst et al., Lebbnik et al., 2001). *Pouwels et al.* порівняли їх активність і стабільність.

Процес ферментативного гідролізу лактози за надвисоких температур для виробництва нових олігосахаридів був розроблений *Petzelbauer* та ін., використовуючи  $\beta$ -глікозидази з *S. solfataricus* і *P. furiosus*. *D'Auria* та ін.

розробили біореакторну систему безперервного гідролізу целобіози для виробництва глюкози шляхом іммобілізації  $\beta$ -глікозидази, виділеної з *S. solfataricus* і експресованої в *Saccharomyces cerevisiae*. Ця система працює з високою швидкістю потоку та демонструє високий ступінь перетворення, продуктивність і стабільність (D'Auria et al.).

Декілька інших ферментів, які розкладають полімери і були виділені з архей, таких як ксиланази та целюлази, мають потенційне застосування у хімічній, фармацевтичній, паперовій, целюлозній промисловості, а також у галузі переробки відходів. Особливий комерційний інтерес викликають ксиланази, які розкладають ксилани — найпоширенішу форму геміцелюлози. Ці ферменти можуть відігравати ключову роль як агенти, що покращують якість продукції, у харчовій, кормовій і целюлозно-паперовій промисловості (Viikari et al.).

Нещодавно ксиланаза, активна при температурах до 100 °C, була охарактеризована в штамі *ANI Thermococcus zilligii*. Цей фермент може розкладати різні ксилани, але не проявляє активності щодо інших вуглеводів (Uhl and Daniel). Детальний огляд ксиланаз, включаючи ті, що виділені з гіпертермофілів, представлений у роботі *Bergquist et al.*

Серед небагатьох целюлаз, відомих у домені *Archaea*, найбільший інтерес викликають целюлаза *CelS* з *S. solfataricus* (Limauro та ін.) та  $\beta$ -ендоглюканаза з *P. furiosus* (Cady та ін.).

Гіпертермофільні протеази мають важливе значення як агенти деградації в рецептурах миючих засобів (Schumacher et al.). Протеази та протеасоми відіграють ключову роль у клітинному метаболізмі архей. Адаптація цих мікроорганізмів до екстремальних середовищ існування опосередковується взаємодією між згортанням білка та гідролізом (Iida та ін., Maupin-Furlow та ін., de Vos та ін., Wadsworth та White).

Ліпази та естерази, виділені з *Archaeoglobus fulgidus* (Manco et al.) і *Sulfolobus shibatae* (Huddleston et al.), були очищені та охарактеризовані. Ці

ферменти представляють значний інтерес для застосування в складі миючих засобів, а також у молочній промисловості .

Гідролази та ізомерази, отримані з надзвичайно галофільних архей, мають потенціал для використання в біотрансформаціях під час виробництва харчових добавок. Крім того, самі мікроорганізми можуть застосовуватися у процесах виготовлення ферментованих харчових продуктів (Margesin and Schinner).

Деякі метаболіти архей, такі як білки, осмотично активні речовини (так звані сумісні розчини), екзополісахариди та спеціальні ліпіди, мають потенційне промислове застосування. Галофільні археї пропонують численні реальні або потенційні можливості у біотехнології. Деякі штами містять пов'язані з мембраною пігменти сітківки, бактеріородопсин (BR) і галородопсин, які дозволяють мікроорганізмам використовувати світлову енергію для керування біоенергетичними процесами (Oren, Lanyi).

Термодинамічна та фотохімічна стабільність BR призвела до його застосування в технічних розробках, таких як голографія, просторові модулятори світла, штучна сітківка, об'ємна та асоціативна оптична пам'ять. Бактеріородопсин, виділений із *Halobacterium salinarum*, наразі комерціалізується компаніями COBEL (Барселона, Іспанія) та Munich Innovative Biomaterials (Мюнхен, Німеччина) (Margesin and Schinner). Крім того, BR може бути використаний для відновлення біохімічної енергії, наприклад, для зворотного перетворення АДФ в АТФ. Було розроблено та запатентовано пристрій на основі BR і АТФ-синтази (Saito et al.).

Галофільні бактерії виробляють сумісні розчинені речовини, які підтримують позитивний водний баланс у клітині та є сумісними з клітинним метаболізмом. Ці сполуки слугують чудовими стабілізаторами для біомолекул (da Costa et al., Welsh, Santos and da Costa). Ектоїн і його похідні були запатентовані як зволожувачі в косметиці (Montitsche et al.), хоча найбільш

перспективним застосуванням є використання як стабілізаторів для полімеразної ланцюгової реакції (Sauer and Galinski).

Сумісні розчинені речовини, що виробляються галофільними археями, включають манозилгліцерат (MG) і дигліцеринфосфат, які були ідентифіковані в *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* та *Archaeoglobus fulgidus*. Стабілізуюча дія MG на кілька ферментів, підданих нагріванню або сублімації, була вищою, ніж у інших стабілізаторів (Lamosa et al.).

Ліпіди архей є унікальними за їхньою топологією та функціями в мембранах архей, а також є важливими еволюційними маркерами серед архей, еукаріотів та бактерій. Ця унікальність викликає значний інтерес до біотехнологічних застосувань таких сполук. Архейні ліпіди є чудовим джерелом для створення ліпосом із високою термостабільністю та герметичністю проти витоку розчинених речовин (Gambacorta et al.).

Крім того, архейні ліпіди пропонуються як мономери для біоелектроніки. Їх біполярна тетраефірна структура відкриває нові можливості для білок-ліпідних взаємодій, що є цікавими для створення електронних пристроїв на основі окисно-відновних білків або ферментів (огляд De Rosa et al.) (Hatfull, 2018).

## РОЗДІЛ 4

### ГАЛОЦИНИ – БАКТЕРІОЦИНИ АРХЕЙ

#### 4.1. Загальні відомості про галоцини та їх біохімічні особливості

Галоархеї (клас *Halobacteria*) — надсолестійкі представники домену *Archaea*, що колонізують гіперсолоні екосистеми. Конкуренція між близькоспорідненими видами у таких нішах підтримується через секрецію антимікробних молекул, серед яких провідну роль відіграють галоцини — білкові та пептидні бактеріоцини архей.

На сьогодні описано понад десять галоцинів, зокрема HalH1, HalH4, HalH6, HalHA1, HalHA3, HalHA4, HalR1, HalA4, HalSech7A, HalSH10, HalS8 і HalC8. Їх поділяють на дві групи (Ri et al., 2023):

- високомолекулярні білкові галоцини (>10 кДа),
- мікрогалоцини (≤10 кДа), що є короткими катионними пептидами.

Більшість галоцинів — це:

- білки або пептиди зі значною кількістю кислих амінокислот (адаптація до середовища  $\geq 3\text{--}4\text{ M NaCl}$ );
- молекули, здатні змінювати проникність цитоплазматичної мембрани цільових архей;
- білки-попередники, що мають сигнальні пептиди системи Tat (RR-мотив), характерні для білків, які експортуються у складених конформаціях.

У декількох галоцинів (HalC8, HalH6, HalH4) встановлено механізми дії, пов'язані з (Lach et al., 2023):

- формуванням пор чи локальним порушенням мембрани;
- іонним дисбалансом;

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шаульський В.О.			<b>РОЗДІЛ 4</b> <b>ГАЛОЦИНИ –</b> <b>БАКТЕРІОЦИНИ АРХЕЙ</b>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					53	123
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

- витоком цитоплазми та подальшим лізисом клітин.

Хоча галоцини функціонально нагадують бактеріоцини бактерій, їхня первинна структура, заряди, залежність від солі та система секреції Tat свідчать про окремий еволюційний шлях у межах архей.

Типовим для галоархей є вироблення специфічних серинових протеаз — галоізинів, які активуються вже після секреції. Відомо, що дозрівання HalH4, HalS8 і HalC8 супроводжується (Platas, Meseguer, & Amils, 2002):

- відсіченням сигнального пептиду Tat-залежною пептидазою;
- можливим додатковим протеолітичним розщепленням галоізинами, що може модифікувати активність галоцину.

Зокрема, штами *Haloferax mediterranei* продукують галоізин HlyR4, здатний взаємодіяти з HalH4.

HalH4 — класичний представник галоцинів високої молекулярної маси (34,9 кДа), який синтезується *Hfx. mediterranei* ATCC 33500. Його ген *halH4* (1080 п.н., HFX\_5264) локалізований на мегаплазміді рHM300 та активується під час переходу клітин до стаціонарної фази.

Подібно до інших галоцинів, HalH4 (Naor, Yair, & Gophna, 2013):

- має Tat-сигнальний пептид;
- експортується у складеній формі;
- потенційно піддається вторинній обробці позаклітинною протеазою HlyR4.

Функціональні спостереження свідчать, що HalH4 змінює проникність мембрани чутливих галоархей, викликаючи витік внутрішнього вмісту. Водночас видалення *halH4* у *H. mediterranei* ATCC 33500 не усуває антигалоархейну активність штаму, що вказує на існування додаткових бактеріоциноподібних молекул.

Окремі дослідження присвячені з'ясуванню ролі HlyR4 у дозріванні HalH4. При одночасній експресії обох білків у *E. coli* встановлено (Naor, Yair, &

Gophna, 2013):

- HlyR4 може розщеплювати HalH4,
- розщеплення супроводжується появою фрагментів із підвищеною антимікробною активністю.

Мас-спектрометричний аналіз продуктів протеолізу дав змогу ідентифікувати активний пептид, а точкові мутації halH4 використані для визначення критичних амінокислот, що забезпечують антагоністичну дію. На основі цих даних запропоновано модель, згідно з якою HalH4 функціонує як білок-попередник, активність якого посилюється після специфічного протеолізу.

#### 4.2. Продуценти галоцинів

Галоцини утворюють різні представники класу *Halobacteria*, зокрема роди *Haloferax*, *Halobacterium*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Natrinema* та *Natronococcus*. Хоча ці археї характеризуються значною геномною різноманітністю, їх об'єднує здатність синтезувати антимікробні білки та пептиди, спрямовані переважно проти споріднених галоархей (Najjari et al., 2020).

Продукція галоцинів найчастіше активується у пізній експоненційній або на початку стаціонарної фази росту, коли виникає конкуренція за ресурси та простір у високосольових екосистемах. Для багатьох видів показано, що бактеріоциногенність може залежати від умов навколишнього середовища, зокрема концентрації NaCl, доступності вуглецевих джерел та щільності популяції. Окремі галоархеї (наприклад, *H. mediterranei* або *Halobacterium salinarum*) продукують одразу кілька антагоністичних факторів, що посилює їх конкурентну перевагу (Najjari et al., 2020).

Антагоністичний спектр галоцинів зазвичай вузький, однак для деяких молекул описано міжродову активність. Найкраще вивчені продуценти — *H. mediterranei*, *H. volcanii*, *H. salinarum*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Halostagnicola larsenii* та *Natrinema pellirubrum*. Їх галоцини різняться за молекулярною масою, типом секреції, залежністю від протеолітичної обробки та механізмом дії (Najjari

et al., 2020).

Для узагальнення основних відомостей щодо галоцинів різних архей нижче наведено таблицю, у якій систематизовано:

продуцентів галоцинів;

типи або назви відповідних бактеріоцинів;

основні відомості про їх антагоністичну активність.

Таблиця 4.1.

#### Архейні продуценти галоцинів

Продуцент	Галоцин	Активність бактеріоцину в культуральній рідині, Од/мл	Антагоністична активність	Джерело
<i>Halobacterium volcanii</i> KPS1	KPS1	120	<i>Staphylococcus aureus</i> MTCC 916 <i>Streptococcus mutans</i> MTCC 896	(Kavitha et al., 2011).
<i>Haloferax larsenii</i> HA3	HA3	80	Тільки археї	(Kumar, & Tiwari, 2017)
<i>Haloferax larsenii</i> HA1	HA1	160	Тільки археї	(Kumar, Saxena, & Tiwari, 2016)
<i>Halorubrum</i> sp. SSR	SSR	2,45	Тільки археї	(Meknaci et al., 2014)
<i>Haloarchaeal</i> S8	S8	128	Тільки археї	(Price, & Shand, 2000)

Отримані дані свідчать, що галоцин KPS1, продукуваний *H. volcanii* KPS1, демонструє найширший спектр антагоністичної дії серед досліджених архейних бактеріоцинів. На відміну від більшості галоцинів, активних переважно проти інших архей, KPS1 ефективно пригнічує *S. aureus* MTCC 916 та *S. mutans* MTCC 896 — ключового карієсогенного збудника. Це робить його унікальним серед архейних антимікробних пептидів і суттєво підвищує його прикладну цінність для стоматологічних препаратів.

Отже, KPS1 є найперспективнішим серед представлених галоцинів завдяки широкому спектру, активності проти медично значущих бактерій та стійкості у гіперсолоних середовищах, що обґрунтовує доцільність його подальшого дослідження.

## РОЗДІЛ 5

### ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

#### 5.1. Характеристика галоцину

Галоцин – це білковий антимікробний агент, що належить до групи архейних бактеріоцинів. Його продукують галофільні археї, насамперед представники роду *Halobacterium*. За своєю природою галоцин є аналогом бактеріальних бактеріоцинів, однак має низку унікальних особливостей, пов'язаних із фізіологією архей (Corral, Amoozegar, & Ventosa, 2019).

Вперше галоцин був описаний у штамів *Halobacterium salinarum*. Надалі з'ясувалося, що різні галофільні археї здатні синтезувати подібні до нього пептидні інгібітори, які об'єднали під загальною назвою «галоцини». Це свідчить про те, що виробництво бактеріоциноподібних молекул у архей є поширеною адаптаційною стратегією для конкурентної боротьби в екстремальних умовах високої солоності (Najjari et al., 2020).

Галоцини є білковими молекулами або пептидами різної молекулярної маси (від кількох до десятків кДа). Їхня характерна властивість – висока стабільність у гіперсолоних середовищах (насичений розчин NaCl), де більшість класичних бактеріальних антибіотиків втрачають активність. Ця особливість робить їх придатними для дії у специфічних біотопах і перспективними для застосування у біотехнології, що пов'язана з соленосними середовищами (O'connor, & Shand, 2002).

Точний механізм дії галоцину залежить від конкретного типу, проте для багатьох з них характерні такі ефекти (Kaur, & Tiwari, 2021; Kumar et al., 2021):

- порушення проникності цитоплазматичної мембрани;
- інгібування життєво важливих ферментативних процесів;
- блокування синтезу клітинних макромолекул.

Особливості порівняно з бактеріальними бактеріоцинами.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Лім.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Шаульський В.О.						
Перевір.		Буценко Л.М.					57	123
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

На відміну від бактеріоцинів, що продукуються бактеріями (*E. coli*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* тощо), галоцини мають кілька важливих відмінностей (Corral, Amoogear, & Ventosa, 2019; Kumar et al., 2021; Dutta, & Vandopadhyay, 2022):

- археї продукують їх у гіперсолоних екосистемах, де конкуренція відбувається між археями та бактеріями;
- галоцини зберігають активність у високих концентраціях NaCl, де більшість білків денатурують;
- деякі галоцини діють не лише на архей, але й на патогенні бактерії, включаючи грампозитивні (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) та грамнегативні (*Escherichia coli*).

Властивість галоцинів пригнічувати ріст патогенних бактерій робить їх перспективними у фармацевтичній сфері. Вони можуть бути використані як основа для створення нових антимікробних препаратів, що потенційно здатні подолати антибіотикорезистентність. Крім того, завдяки стабільності у екстремальних умовах, галоцини можуть застосовуватися в харчовій промисловості (біоконсервування продуктів із високим вмістом солі) та у біотехнологічних процесах, що відбуваються у солоних середовищах (Lach et al., 2023).

Галоцин KPS1 був вперше виявлений у штаму *Halobacterium volcanii* KPS1, ізолюваного з високосолоних екосистем. Як і інші архейні бактеріоцини, KPS1 продукується для конкурентної переваги в умовах, де мікроорганізми борються за обмежені ресурси при екстремальній концентрації NaCl (Kavitha et al., 2011).

Галоцин KPS1 є білковим антимікробним агентом з молекулярною масою близько 14 кДа (за даними SDS-PAGE). Він відноситься до так званих «низькомолекулярних галоцинів» (Martínez-Espinosa, 2024). Особливістю є його висока стабільність (Kavitha et al., 2011):

- зберігає активність у розчинах з концентрацією NaCl понад 3–4 М;

- витримує нагрівання до 80 °С без суттєвої втрати антимікробних властивостей;
- чутливий до протеолітичних ферментів (протеїнази К, трипсин), що підтверджує білкову природу.

Галоцин KPS1 демонструє широкий спектр дії. Було показано, що він пригнічує не лише інші археї, але й певні бактерії. Зокрема, встановлено його середню активність проти (Kavitha et al., 2011):

*Staphylococcus aureus* МТСС 916 – патоген, що викликає гнійно-запальні інфекції та сепсис (Taylor, & Unakal, 2017);

*Streptococcus mutans* МТСС 896 – основний збудник карієсу, що належить до патогенів ротової порожнини (Fang et al., 2024).

Здатність архейного галоцину пригнічувати патогенні грампозитивні бактерії є винятковою властивістю, оскільки більшість відомих бактеріоцинів мають вузький спектр дії.

Для KPS1 передбачаються класичні механізми бактеріоцинів низької молекулярної маси (Corral, Amoozegar, & Ventosa, 2019; Kumar et al., 2021; Dutta, & Vandopadhyay, 2022):

- зв'язування з клітинною мембраною чутливих мікроорганізмів;
- порушення бар'єрних функцій мембрани, що призводить до втрати іонного балансу;
- блокування життєво важливих процесів у клітині (синтез ДНК, білка або клітинної стінки).

Хоча повний механізм ще недостатньо досліджений, спостереження за морфологією клітин-субстратів підтверджують мембранотропну дію.

Антимікробна активність KPS1 проти патогенних *Staphylococcus* та *Streptococcus* відкриває перспективу його застосування у медицині для боротьби з антибіотикорезистентними інфекціями. Окрім того, його стабільність у солоних середовищах робить цей галоцин перспективним для використання в (Kavitha et al., 2011; Lach et al., 2023):

- харчовій промисловості (консервування продуктів із високим вмістом солі);
- біотехнологічних процесах із екстремальними умовами середовища;
- фармацевтичній біотехнології як прототипу нових антимікробних агентів.

Одним із найважливіших об'єктів дії галоцину KPS1 є *S. aureus* МТСС 916. Це грампозитивний кок, який зазвичай входить до складу нормальної мікрофлори шкіри та слизових оболонок людини, однак за певних умов стає збудником широкого спектра інфекцій. *S. aureus* здатний спричиняти гнійно-запальні ураження шкіри, такі як фурункули, абсцеси чи імпетиги, а також інфекції ран та післяопераційні ускладнення. Крім того, він може бути етіологічним агентом більш серйозних захворювань — пневмонії, остеомієліту, ендокардиту, сепсису. Важливою особливістю є здатність деяких штамів продукувати ентеротоксини, що викликають харчові інтоксикації та токсичний шок. У клінічній практиці *S. aureus* відомий як один із провідних збудників внутрішньолікарняних інфекцій, особливо у формі метицилін-резистентних штамів (MRSA), які є серйозною проблемою сучасної медицини. Той факт, що галоцин KPS1 пригнічує ріст *S. aureus*, свідчить про потенційну можливість його використання як альтернативного антимікробного агента для боротьби з резистентними стафілококовими інфекціями (Kavitha et al., 2011; Taylor, & Unakal, 2017).

Іншим важливим патогеном, чутливим до галоцину KPS1, є *S. mutans* МТСС 896. Це грампозитивний факультативний анаероб, що є одним із домінуючих мешканців зубної бляшки. *S. mutans* відіграє ключову роль у патогенезі карієсу, оскільки здатний ферментувати вуглеводи з утворенням органічних кислот, які демінералізують емаль зубів. Крім того, він бере участь у формуванні біоплівки у ротовій порожнині, що забезпечує його стійкість до дії антисептиків і сприяє хронізації інфекційного процесу. Наявність *S. mutans* асоціюється не лише зі стоматологічними проблемами, такими як карієс чи

пародонтит, але й з ризиком розвитку системних уражень, зокрема бактеріємії та ендокардиту, особливо у пацієнтів із супутніми захворюваннями серцево-судинної системи. Антимікробна активність галоцину KPS1 проти *S. mutans* є перспективною з огляду на можливість його використання у стоматології — наприклад, у складі ополіскувачів для ротової порожнини, біосумісних покриттів чи інших протикарієсних засобів, що могли б доповнити сучасні методи профілактики (Kavitha et al., 2011; Fang et al., 2024).

Спектр антимікробної дії галоцину KPS1 охоплює два клінічно важливих патогени, що відрізняються за локалізацією та типом інфекцій, які вони спричиняють. Здатність інгібувати *S. aureus* робить його перспективним агентом для медицини загального профілю та боротьби з внутрішньолікарняними інфекціями, тоді як активність проти *S. mutans* відкриває нові можливості для застосування у стоматологічній практиці. Це підкреслює унікальний потенціал архейних бактеріоцинів, зокрема галоцину KPS1, як інноваційних антимікробних сполук (Kavitha et al., 2011).

Попри те, що галоцин KPS1 демонструє активність як проти *S. aureus* MTCC 916, так і проти *S. mutans* MTCC 896, для подальшого обґрунтування розробки препарату доцільним є фокусування саме на боротьбі з *S. mutans*. Такий вибір пояснюється низкою аргументів.

По-перше, проблема резистентних штамів *S. aureus*, зокрема MRSA, безумовно є однією з найсерйозніших у сучасній медицині. Однак терапія таких інфекцій потребує не лише ефективного антимікробного агента, а й складного клінічного супроводу, включно з внутрішньолікарняним моніторингом, системною антибіотикотерапією та контролем за розвитком септичних ускладнень. Це робить розробку нового засобу на основі архейних бактеріоцинів надзвичайно перспективною, проте водночас дуже складною і довготривалою задачею.

По-друге, карієс, пов'язаний з інфекцією *S. mutans*, залишається одним із найбільш поширених інфекційних захворювань у світі, яке уражає до 90 % населення різного віку (Cherukuri et al., 2020). На відміну від

внутрішньолікарняних стафілококових інфекцій, проблема карієсу має не лише клінічний, а й соціальний вимір, оскільки пов'язана з якістю життя, дитячим здоров'ям та економічними витратами на стоматологічну допомогу (Foláyan et al., 2025).

По-третє, розробка антимікробного препарату або засобу профілактики, спрямованого проти *S. mutans*, є значно більш реалістичною з точки зору біотехнології. Галоцин KPS1 може бути використаний у складі місцевих засобів — ополіскувачів для ротової порожнини, зубних паст чи біосумісних покриттів для стоматологічних матеріалів. У такому разі не потрібне системне введення препарату, а отже, знижується ризик імунологічних ускладнень та потенційної токсичності.

Фокусування на *S. mutans* як на мішені для галоцину KPS1 є обґрунтованим з позицій практичної реалізації. Це дозволяє створювати профілактичні та терапевтичні засоби, спрямовані на масово поширене захворювання, з можливістю швидшої та безпечнішої інтеграції у стоматологічну практику. Водночас активність проти *S. aureus* залишається важливим науковим результатом, який підкреслює потенціал архейних бактеріоцинів для майбутніх досліджень у галузі антимікробної терапії.

## **5.2. Огляд ринку цільової (аналогічної) продукції**

Вибір лікарської форми є ключовим етапом при розробці препарату на основі галоцину KPS1. Серед можливих варіантів застосування антимікробних пептидів у стоматологічній практиці (ополіскувачі, гелі, зубні паста, біосумісні покриття) особливу увагу привертає форма зубного лаку. Це пов'язано з низкою фармацевтичних, технологічних та клінічних переваг (Zhang et al., 2023; Yin et al., 2025).

По-перше, зубні лаки забезпечують локалізовану дію на поверхні зубів, що дозволяє зосередити ефективну концентрацію діючої речовини без необхідності системного введення (Baik et al., 2021). У випадку з білковими молекулами, такими як галоцин KPS1, це має вирішальне значення, оскільки уникається руйнування у шлунково-кишковому тракті та потенційна

імуногенність при системному застосуванні.

По-друге, зубний лак утворює на емалі стійку плівку, що забезпечує тривале вивільнення діючої речовини та подовжений антимікробний ефект (Na, & Choi, 2024). Це важлива характеристика для профілактики карієсу, адже *S. mutans* здатний швидко колонізувати поверхню зуба та формувати біоплівку, яка захищає його від короткочасної дії антисептиків.

По-третє, дана лікарська форма є технологічно доступною для виробництва. Для інкорпорації пептидної молекули у лак достатньо проміжного ступеня очистки, що значно знижує вартість порівняно з високоефективними методами (хроматографія), необхідними для ін'єкційних препаратів.

На сучасному ринку представлено декілька препаратів у формі зубних лаків, які застосовуються у стоматологічній практиці переважно з профілактичною метою. Найбільш відомими є фторвмісні лаки, антисептичні лаки та лаки з біоактивними компонентами (Baik et al., 2021).

Одним з прикладів є Cervitec Plus®, який поєднує хлоргексидин диглюконат (0,3%) та тимол (0,5%). Препарат чинить виражену антибактеріальну дію проти карієсогенних та пародонтопатогенних мікроорганізмів, а його полімерна матриця забезпечує пролонговане вивільнення активних речовин.



Рис.5.1. Зубний лак Cervitec Plus®

<https://tsdental.com.ua/ru/shop/ivoclar/care/cervitec/cervitec-plus-single-dose-assortment-20>

Ще один варіант — Fluor Protector®, який містить низькі концентрації фтору (0,1%) у поєднанні з уретан-акрилатною смолою. Цей лак утворює тонку

прозору плівку, що забезпечує косметичну привабливість і водночас ремінералізуючий ефект.



Рис.5.2. Зубний лак Fluor Protector®

<https://tsdental.com.ua/shop/ivoclar/klinichni-materiali/care/fluor-protector/fluor-protector-s-1x7g>

Аналіз існуючих аналогів свідчить про те, що зубні лаки широко використовуються у стоматології як носії антимікробних та ремінералізуючих агентів. Досвід застосування фторидів, хлоргексидину та тимолу підтверджує ефективність даної лікарської форми для локального контролю карієсогенних мікроорганізмів. Це створює міцну основу для розробки нового лаку з галоцином KPS1, який зможе поєднати властивості антимікробного пептиду з технологічними перевагами даної форми.

Таблиця 5.1

**Порівняльна таблиця зубних лаків, що присутні на ринку**

Препарат	Активна речовина	Матриця (основа)	Основний механізм дії	Особливості застосування
<b>Cervitec Plus®</b>	0,3% хлоргексидин + 0,5% тимол	Полімерна смола	Антимікробна дія проти <i>S. mutans</i> та пародонтопатогенів	Пролонговане вивільнення, використання у профілактиці гінгівіту
<b>Fluor Protector®</b>	0,1% фторид	Уретан-акрилатна смола	Ремінералізація, бар'єрний захист	Прозора плівка, косметична привабливість

Аналіз існуючих лікарських форм у вигляді зубних лаків дає змогу окреслити основні орієнтири для розробки нового препарату з галоцином KPS1. Досвід застосування Cervitec Plus® підтверджує, що зубні лаки можуть ефективно використовуватися не лише як засіб ремінералізації, але й як носій антимікробних агентів, спрямованих проти карієсогенних мікроорганізмів. Це безпосередньо співвідноситься з метою використання галоцину KPS1 проти *S. mutans*, що робить цей препарат найбільш близьким аналогом з погляду фармакологічної дії.

У свою чергу, Fluor Protector® демонструє, що сучасні лаки можуть мати косметично привабливі властивості завдяки прозорій матриці на основі уретан-акрилатів. Для препарату з галоцином KPS1 цей аспект може мати важливе значення, оскільки він підвищує прийнятність засобу пацієнтами і дозволяє використовувати його у педіатричній стоматології.

Аналіз прототипів свідчить, що при створенні зубного лаку з галоцином KPS1 доцільно інтегрувати позитивні риси існуючих аналогів: використати колофоній чи полімерну смолу як матрицю, забезпечити пролонговане вивільнення пептиду для стійкої антимікробної дії проти *S. mutans*, а також зберегти косметичну привабливість готового препарату.

### **5.3. Визначення концентрації галоцину**

Для розрахунку річної потіжності галоцину для початку потрібно знати активність ферменту та його концентрацію в культуральній рідині. Як основну статтю обрано роботу Kavitha та ін. (2011). Активність галоцину в супернатанті становить 120 Од/мл. На жаль, концентрації заданого бактеріоцину не наведено, тому пропонується її перерахувати.

Відомо, що бактеріоцини – це білкові сполуки. В середньому на білок припадає 16% азоту (Tipton, & Wolfe, 2004) та 53% карбону (Rouwenhorst, Jzn, Scheffers, & van Dijken, 1991). Для культивування використовувалось середовище бульйон для галофілів (Hi-Media M590), його склад наступний (г/л) (<https://www.himedialabs.com/media/TD/M590.pdf>):

Ациказа – 10,

Дріжджовий екстракт – 10,

Протеозний пептон – 5,

Цитрат натрію – 3,

KCl – 2,

MgSO<sub>4</sub> – 25,

NaCl – 250

Для подальшого розрахунку нас цікавлять такі компоненти поживного середовища: ациказа, дріжджовий екстракт та протеозний пептон. За специфікацією ациказа містить близько 11% азоту, щодо карбону – інформації не наведено. Ациказа є гідролізатом казеїну, тому по вмісту карбону будемо орієнтуватись саме на цей компонент (<https://www.himedialabs.com/media/TD/RM498.pdf>). Казеїн містить 52,3% карбону (Jia et al., 2017). Тож, можемо дізнатись кількість азоту та карбону, що надійде з ацикази. З 10 г можна одержати  $10 \cdot 0,11 = 1,1$  азоту та  $10 \cdot 0,52 = 5,2$  г карбону. Дріжджовий екстракт та протеозний пептон в середньому містять 10% азоту та близько 40% карбону (Tomé, 2021; Moreira, Silva, & Cremasco, 2020). Отже, з цих компонентів можна отримати  $(10+5) \cdot 0,1 = 1,5$  г азоту та  $(10+5) \cdot 0,4 = 6$  г карбону. Тож, загальна кількість азоту:  $1,1+1,5 = 2,6$  г; карбону:  $5,2+6 = 11,2$  г.

Щодо карбону, приймаємо те, що половина піде на холосте окислення, отже для метаболізму залишається  $11,2/2 = 5,6$  г карбону. Припускаємо, що більша частина (70%) піде на синтез біомаси, тоді для синтезу бактеріоцину залишиться  $5,6 \cdot 0,3 = 1,68$  г карбону. Тож, з середовища теоретично можна отримати  $1,68/0,53 = 3,17$  г бактеріоцину.

Щодо азоту, приймаємо, що 70% піде на біомасу, тоді на азот  $2,6 \cdot 0,3 = 0,78$  г. З цього азоту можна отримати  $0,78/0,11 = 7,1$  г бактеріоцину. Карбон буде лімітувальним фактором, тому приймаємо, що максимально можлива концентрація бактеріоцину становить 3,17 г/л.

Знаючи концентрацію, можемо дізнатись теоретичну концентрацію бактеріоцину. В 1 мл знаходиться 120 Од активності, тоді, дізнаємось, скільки мг бактеріоцину знаходиться в 1 мл:

$$3,17 - 1000$$

$$X - 1$$

$$\frac{3,17}{1000} = 0,00317 \text{ г} = 3,17 \text{ мг}$$

Отже, на 3,17 мг припадає 120 Од активності, тоді, кількість Од/мг становитиме:

$$\frac{120}{3,17} = 37,85 \text{ Од/мг}$$

#### **5.4. Розрахунок річної потужності виробництва**

Для розрахунку потреби пропонується спиратися на препарат Servitac Plus®, який випускається як препарат з одинарною дозою (0,25 г) по 20 туб. Одна туба призначена для нанесення одного або кількох зубів за один сеанс. За статистичними даними наразі відомо, що на карієс страждає 92% населення України (<https://stomaestet.com.ua/dental-service/dentaltreatment/caries-treatment/>). Станом на 2025 рік населення країни становить 32,9 млн. Отже, проблеми з карієсом мають щонайменше:

$$32\,900\,000 \times 0,92 = 30\,268\,000 \text{ людей}$$

Забезпечити всю країну, з врахуванням наявних аналогів неможливо, тим паче, що запропонована розробка є експериментальною. Тому, пропонується для початку забезпечити лише 15% від людей, що мають проблеми та звернуться до стоматолога:

$$30\,268\,000 \times 0,15 = 4\,540\,200 \text{ людей}$$

Спираючись на те, що запропоноване коло осіб хоча б один раз на рік звернеться до стоматолога, а спеціаліст витратить щонайменше одну дозу на кожного пацієнта, кількість доз на рік становить 4 540 200 шт.

При перевірці безклітинного екстракту було з'ясовано, що галоцин мав середній ступінь інгібування (Kavitha et al., 2011), що є оптимальним для застосування і препараті для ротової порожнини, оскільки достеменно невідомо, як цей бактеріоцид буде впливати на мікроорганізми ротової порожнини. При цьому, концентрація становила 120 Од/мл. Отже, для оптимального забезпечення

роботи нового препарату потрібно забезпечити 120 Од/дозу.

При розрахунку одиниць активності бактеріоцину маємо врахувати 2 чинники: відсоток втрат при виділенні та очищенні й зміна активності бактеріоцину після очистки. Спираючись на статтю Kumar & Tiwari (2017), пропонується передбачити очистку, де ключовими етапами є тангенціальна фільтрація та гель-хроматографія. В статті передбачається ще додатково аніонообмінна хроматографія, проте для виробництва запропонованого препарату така очистка недоцільна. По-перше – високі втрати (залишок бактеріоцину від початкової кількості - 12,8%), по-друге, порівнюючи смужки по електрофоретичному аналізу, рівень забрудненості препарату після гель-фільтрації є прийнятним для використання такої субстанції в препараті для ротової порожнини. Порівняння смужок можна побачити на рис.5.3.



Рис.5.3. Порівняння смужок очистки галоцину після гель-хроматографії (А) та аніонообмінної хроматографії (Б) (Kumar, & Tiwari, 2017)

Кількість бактеріоцину після гель хроматографії становить 64% від початкової кількості, а його активність збільшується майже на 50% (коефіцієнт – 1,497). Тож, в 1 мг очищеного галоцину буде:

$$37,85 * 1,497 = 56,66 \text{ Од активності}$$

Тоді, для забезпечення в 1 дозі препарату необхідно:

$$\frac{120}{56,66} \approx 2,1 \text{ мг галоцину}$$

На зазначену потребу необхідно:

$$4\,540\,200 \times 2,1 = 9\,534\,420 \text{ мг} \approx 9,53 \text{ кг галоцину}$$

Враховуючи втрати (приймаємо, що кількість втрат становить 40%, що наближено до залишку бактеріоцину в 64% після очистки), кількість галоцину на рік становить:

$$\frac{9,53}{(1 - 0,4)} \approx 15,9 \text{ кг}$$

Таку кількість галоцину можна одержати із наступної кількості культуральної рідини:

$$\frac{15,9}{3,17} \approx 5 \text{ м}^3$$

Припустимо, що кількість трудоднів нашого виробництва сягає близько 55 днів. Тоді, за одну добу кількість культуральної рідини складе:

$$5000/55 \approx 90,9 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ( $V_{\text{крц}}$ ):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 90,9 \cdot 127 / 24 \approx 530 \text{ л},$$

де  $T_{\text{цф}}$  - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 120 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 127 годин.  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1$ ).

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 530$  л культуральної рідини.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 530 / (1 - 0,1) = 589 \text{ л},$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$V_{\text{роб.1}} = 589$  л.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{\text{ф.1}} = 589 / 0,6 = 982$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 1 \text{ м}^3$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 589 / 1000 = 0,589$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією. Галофільні археї можуть рости в аеробних та анаеробних умовах (Galiana et al., 2022). Оскільки в основній статті не конкретизовано про подачу чи відсутність повітря, приймаємо, що культивування було за наявності кисню.

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 589 / (1 + 0,1) = 535,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 589 - 535,5 = 53,5 \text{ л}$$

Для одержання 53,5 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 53,5 / (1 - 0,1) \approx 59,4 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятору  $V_{\text{ін}} = 59,4 / 0,6 = 99$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат  $V_{\text{сін}} = 100$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 59,4 / 100 = 0,594$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 59,4 / (1 + 0,1) \approx 54 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 59,5 - 54 = 5,5 \text{ л}$$

Для одержання 5,5 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в

результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5,5 / (1 - 0,1) \approx 6,1 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятору  $V_{\text{ін}} = 6,1 / 0,6 = 10,1 \text{ л}$ .

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат  $V_{\text{сін}} = 10 \text{ л}$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 6,1 / 10 = 0,61$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,1 / (1 + 0,1) \approx 5,5 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 6,1 - 5,5 = 0,6 \text{ л}$$

0,6 л посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 600 / (750 \times 0,2) = 4 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи.

Висновки щодо кількості стадій підготовки посівного матеріалу, об'ємів ферментаційного обладнання і об'ємів води для підготовки поживного середовища на всіх етапах процесу наведено у табл. 5.2.

**Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для  
підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу**

<b>Об'єм ферментера, м<sup>3</sup></b>	<b>Коефіцієнт заповнення</b>	<b>Робочий об'єм ферментера (об'єм середовища) м<sup>3</sup></b>	<b>Об'єм посівного матеріалу (10%), м<sup>3</sup></b>	<b>Конденсат (10%), м<sup>3</sup></b>	<b>Об'єм води для приготування композицій середовища, м<sup>3</sup></b>
1	0,6	0,6	0,06	0,06	0,48
0,1	0,6	0,06 (60 л)	0,006 (6 л)	0,006 (6 л)	0,048 (48 л)
0,01 (10 л)	0,6	0,006 (6 л)	0,0006 (0,6 л)	0,0006 (0,6 л)	0,0048 (4,8 л)

## РОЗДІЛ 6

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

#### 6.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання галоцину

Виділення та очищення галоцину передбачає послідовність стадій, метою яких є одержання біологічно активного та стабільного препарату у максимально чистому вигляді. Для одержання культурального фільтрату (CFS) культуральну рідину центрифугували при 10 000 об/хв протягом 20 хв, відокремлюючи надосадову рідину. Отриманий CFS піддавали стерилізації шляхом фільтрування через 0,2-µм мембранний фільтр.

Очищення галоцину розпочинали з тангенціальної потокової фільтрації (TFF). Для цього 1 л стерилізованого CFS пропускали через 0,4-µм hollow-fiber картридж системи АКТА Flux-S, а ультрафільтрацію проводили на картриджі з номінальною молекулярною масою затримання 10 kDa. Процес здійснювали за таких параметрів: тиск подачі 0,44 bar, тиск ретентату 0,27 bar, трансмембранний тиск 0,35 bar, флюкс 14,8 LMH, швидкість потоку 100 мл/хв, температура 25 °C. Ретентат і пермеат тестували на антимікробну активність, причому активність реєстрували лише у ретентаті. Активний концентрат ліофілізували та розчиняли у мінімальному об'ємі буфера 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), що містив 0,15 M NaCl. Етап ліофілізації для промислової безперервної очистки є недоцільним.

Подальше очищення виконували методом гель-фільтраційної хроматографії. Використовували попередньо упаковану колонку HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR (об'єм 120 мл, розміри 1,6 × 60 см), інтегровану в систему АКТАprime plus. Колонку рівноважували тим самим буфером — 50 mM Tris-Cl (pH 8,0) + 0,15 M NaCl. У колонку вносили 3 мл зразка концентрацією 1,68 мг/мл та здійснювали розділення зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв і відбором фракцій по

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Шаульський В.О.</i>			РОЗДІЛ 6 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ		
<i>Перевір.</i>		<i>Буценко Л.М.</i>					
<i>Реценз.</i>							
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					
					<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архивів</i>
						73	123
					<i>Кафедра БТМ</i>		

1 мл. Елюювані фракції детектували за поглинанням при OD<sub>214</sub>, паралельно реєстрували їхню провідність (mS/cm). Кожну фракцію досліджували на антимікробну активність у тесті AWDA, а також аналізували за допомогою tricine SDS-PAGE для підтвердження наявності білкових смуг, що відповідають активному компоненту. Активні фракції з декількох прогонів об'єднували й використовували у подальших експериментальних етапах (Kumar, & Tiwari, 2017).

Завершальним кроком є стабільне зберігання очищеного галоцину. Короткостроково його підтримують у буфері при температурі 2–8 °C, тоді як для довготривалого зберігання застосовують ліофілізацію або заморожування при –80 °C у присутності кріопротекторів. Такий підхід забезпечує збереження активності пептиду та запобігає деградації під час багаторазового використання (Kumar, & Tiwari, 2017). Проте, через термостабільність галоцину (все ж таки виділений з екстремальних термофільних архей) вид сушіння для промислового одержання може бути змінений на більш жорсткіший.

Узагальнена схема виділення та очищення галоцину включає вирощування продуцента, видалення клітин та стерилізацію культуральної рідини, концентрування і десальтацію активного препарату, подальше хроматографічне очищення, контроль біологічної активності та стабілізацію. Послідовне виконання цих етапів дає можливість отримати біологічно активний пептид у придатному для подальших досліджень вигляді та закладає основу для його масштабування.

#### **6.1.1. Обґрунтування етапу одержання супернатанту з позаклітинним галоцином**

На першій стадії виділення галоцину необхідно відокремити клітини продуцента від середовища культивування, отримавши стерильний супернатант, що містить позаклітинний цільовий продукт. Саме якість цього кроку визначає подальший успіх очищення, оскільки присутність клітинних залишків, протеаз або нерозчинних фрагментів може призвести до втрати біологічної активності пептиду (Kumar, & Tiwari, 2017).

У даній роботі для відокремлення клітин обрано центрифугування. Цей метод ґрунтується на осадженні мікробних клітин під дією відцентрової сили, що забезпечує ефективне розділення клітинної біомаси та надосадової рідини. Центрифугування є універсальним і добре апробованим способом обробки культуральних рідин у мікробіології та біотехнології. Його ключовою перевагою є можливість швидко обробляти великі об'єми (від сотень мілілітрів до кількох літрів) за відносно короткий час, отримуючи прозорий супернатант, придатний до подальшої мембранної фільтрації. Крім того, процес не супроводжується впливом високих температур чи агресивних реагентів, що є критично важливим для збереження активності термолабільних антимікробних пептидів (Карлаш, 2022).

Разом із тим, існують альтернативні методи відокремлення клітин, які варто розглянути. Одним із таких методів є фільтрація через мікропористі мембрани. Вона дозволяє отримати стерильний супернатант безпосередньо, минаючи стадію центрифугування. Однак цей підхід має низку суттєвих обмежень. По-перше, висока щільність біомаси у культуральній рідині швидко забиває фільтри, що значно знижує їх пропускну здатність і потребує багаторазової заміни мембран. Це робить процес економічно не вигідним і технічно складним для обробки великих об'ємів. По-друге, при роботі з культурами, що продукують в'язкі полімери (екзополісахариди, слиз), ризик колматажу мембрани ще більше зростає, що обмежує практичне застосування методу (Карлаш, 2022; Kumar, & Tiwari, 2017).

Іншою альтернативою є седиментація під дією гравітації, яка не потребує спеціального обладнання. Проте цей метод має низьку ефективність, оскільки процес відстоювання займає тривалий час (від кількох годин до доби) і не гарантує повного відділення клітин від супернатанту. Крім того, під час такого відстоювання зберігається контакт клітин із культуральною рідиною, що може призвести до часткової деградації секретованого галоцину під дією клітинних протеаз. Тому для пептидів із високою біологічною активністю цей метод є непридатним (Карлаш, 2022).

Висновки: серед можливих способів відокремлення клітин від культуральної рідини центрифугування є найбільш доцільним варіантом, оскільки поєднує швидкість, ефективність та відносну простоту реалізації. Його застосування дозволяє отримати прозорий супернатант без істотних втрат цільового продукту і без ризику інгібування антимікробної активності галоцину. Саме тому даний метод був обраний як оптимальний для першого етапу виділення препарату.

### **6.1.2. Обґрунтування необхідності одержання супернатанту, вільного від клітин**

Після культивування продуцента першим критичним завданням є отримання культуральної рідини, вільної від клітинної біомаси. Галоцин належить до позаклітинних антимікробних пептидів, які секретуються в середовище, тому цільовий продукт локалізується не всередині клітин, а саме у надосадовій рідині. Відтак, наявність клітин та клітинних залишків у подальшому препараті не лише не є необхідною, але й становить серйозний технологічний бар'єр (Kumar, & Tiwari, 2017).

По-перше, присутність клітин продуцента в отриманому матеріалі може призвести до деградації галоцину. Клітини містять внутрішньоклітинні протеази, які навіть після руйнування або автолізу здатні гідролізувати білкові й пептидні сполуки (Lucana et al., 2021). Тож, якщо клітини не будуть вилучені, існує ризик часткової або повної втрати антимікробної активності препарату ще до початку етапів концентрування та очищення.

По-друге, клітини та їхні уламки істотно ускладнюють подальшу мембранну фільтрацію та ультрафільтрацію. Осаджена біомаса або мікроскопічні залишки клітин здатні швидко забивати мембрани, знижуючи їхню пропускну здатність і підвищуючи гідравлічний опір системи (Карлаш, 2022). Це не лише зменшує продуктивність процесу, а й робить його економічно не вигідним. Наявність клітинної суспензії також ускладнює рівномірну роботу хроматографічних колонок, оскільки частинки можуть створювати артефакти у вигляді нерівномірного розподілу потоку.

По-третє, відсутність клітин у супернатанті має значення з точки зору відтворюваності та безпеки. Клітини продуцента можуть споживати поживні речовини чи секретувати метаболіти, які змінюють рН, окисно-відновний потенціал чи інші параметри середовища, що, у свою чергу, може впливати на стабільність галоцину. Крім того, якщо йдеться про фармацевтичні перспективи використання, присутність живих клітин у препараті робить його непридатним для застосування та не відповідає вимогам біобезпеки.

Одержання супернатанту, вільного від клітин (cell-free supernatant), є обов'язковою передумовою для наступних етапів очищення галоцину. Це дозволяє забезпечити збереження біологічної активності цільового продукту, підвищити ефективність мембранних та хроматографічних методів і гарантувати відтворюваність технології у лабораторних та промислових умовах. Саме тому у даній роботі на першому етапі виділення передбачено вилучення клітинної біомаси шляхом центрифугування, що забезпечує одержання прозорої рідини з максимально можливим вмістом активного позаклітинного пептиду.

Одержання супернатанту, вільного від клітин (CFS), є ключовою передумовою для подальших етапів концентрування та очищення галоцину. Після відділення клітинної маси центрифугуванням надосадова рідина може містити залишкові клітини, спори чи фрагменти клітинних оболонок, які створюють ризик контамінації та деградації продукту. Тому обов'язковим є застосування додаткового етапу фільтрації через мембранні фільтри з діаметром пор 0,22–0,45 мкм. Така фільтрація виконує відразу декілька функцій: забезпечує повне видалення клітин, запобігає подальшому мікробному росту у зразку та створює умови для безперешкодної роботи мембранних і хроматографічних систем (Kumar, & Tiwari, 2017).

Вибір саме мембранної фільтрації як методу обґрунтовується низкою переваг. По-перше, вона дозволяє гарантувати майже повне вилучення клітинних структур без використання термічної стерилізації, що є критично важливим для збереження активності термолабільних антимікробних пептидів. По-друге, цей метод є простим у виконанні, не потребує додаткових реагентів і

може бути легко масштабований у лабораторних та промислових умовах. По-третє, фільтрація не змінює складу культуральної рідини та не впливає на стабільність продукту, що робить її універсальним способом підготовки зразків (Kumar, & Tiwari, 2017; Kamalesh, Karishma, Saravanan, & Yaashikaa, 2024).

Альтернативними підходами до одержання супернатанту, вільного від клітин, є, по-перше, термічна стерилізація (наприклад, пастеризація або автоклавування), яка ефективно знищує клітини, але водночас призводить до денатурації білків і втрати біологічної активності галоцину. Такий метод є непридатним для роботи з антимікробними пептидами. По-друге, можливим варіантом є застосування хімічних консервантів або бактерицидних агентів (наприклад, додавання азиду натрію чи антибіотиків), проте їхня присутність може негативно впливати на структуру білка та створює ризик інтерференції під час антимікробних тестів. Використання ультразвукової обробки або інших фізичних методів руйнування клітин у середовищі не дає змоги отримати прозору рідину, вільну від клітинних компонентів, а навпаки підвищує вміст клітинних уламків і протеаз у супернатанті (Карлаш, 2022).

Саме поєднання центрифугування для первинного видалення біомаси з подальшою мембранною фільтрацією через мікропористі фільтри є найбільш доцільним та обґрунтованим підходом для отримання супернатанту, вільного від клітин. Такий метод гарантує збереження біологічної активності галоцину, запобігає ризикам мікробного росту та створює умови для ефективної роботи наступних етапів концентрування і хроматографічного очищення. Для промислового застосування сенсу в використанні фільтрів на 0,2 мкм немає, оскільки вони будуть постійно забиватись, а фільтру на 0,4 мкм буде достатньо для видалення клітин та їх залишків (оскільки в лабораторному варіанті передбачається спочатку фільтрація крізь 0,2 мкм, а потім через 0,4 мкм) (Kumar, & Tiwari, 2017).

### **6.1.3. Обґрунтування стадії концентрування та часткового очищення галоцину**

Після отримання супернатанту, вільного від клітин, концентрація

галоцину у культуральній рідині зазвичай є недостатньою для подальших біоаналітичних досліджень та хроматографічного очищення. Крім того, культуральне середовище містить значну кількість низькомолекулярних сполук (солей, метаболітів, залишків живильних компонентів), які можуть заважати визначенню антимікробної активності та впливати на ефективність подальшої очистки. Саме тому важливим етапом є концентрування та часткове очищення галоцину, яке водночас дозволяє підвищити його відносний вміст у зразку та видалити домішки, що не мають біологічної цінності (Kumar, & Tiwari, 2017).

Для досягнення цієї мети застосовують методи мембранної ультрафільтрації з використанням картриджів із певним молекулярно-масовим обмеженням (10 кДа). Такий підхід має кілька переваг. По-перше, він забезпечує одночасне збагачення білкового компоненту та видалення низькомолекулярних речовин (процес десальтації). По-друге, ультрафільтрація здійснюється при низьких температурах та м'яких умовах, що дозволяє зберегти активність термолабільних антимікробних пептидів. По-третє, метод є масштабованим і легко адаптується як для лабораторних досліджень, так і для промислового виробництва (Kumar, & Tiwari, 2017).

Ультрафільтрація на даному етапі виконує дві функції:

Підвищення концентрації білка — створює передумови для проведення біоактивності-тестів і наступної хроматографії.

Десальтація — видаляє солі та інші низькомолекулярні сполуки, які можуть призводити до інактивації продукту або інтерференції під час аналітичних вимірювань.

Альтернативними підходами можуть бути, з одного боку, осадження білків органічними розчинниками (наприклад, етанолом чи ацетоном) або солями (аміакосульфатне осадження), що дійсно дозволяє концентрувати білки (Ha et al., 2021). Проте такі методи мають суттєві недоліки: вони часто супроводжуються частковою денатурацією пептидів, потребують додаткових стадій діалізу для видалення осаджувальних агентів і є менш відтворюваними. З іншого боку, ліофілізація культуральної рідини може застосовуватись як метод

концентрування, але вона не забезпечує видалення низькомолекулярних компонентів, а також потребує значних енергетичних витрат і тривалого часу (Карлаш, 2022).

Стадія ультрафільтраційного концентрування є найбільш доцільним вибором, оскільки дозволяє одночасно підвищити концентрацію галоцину та здійснити його часткове очищення від домішок. Це створює оптимальні умови для подальшої високоефективної хроматографічної очистки та зберігає біологічну активність продукту.

#### **6.1.4. Обґрунтування використання хроматографічних методів для остаточного очищення галоцину**

Після стадії концентрування та десальтації отриманий ретентат містить збагачений галоцин, але все ще залишається складною сумішшю білкових і низькомолекулярних домішок. Для одержання препарату високої чистоти та придатного до подальших біоаналітичних досліджень застосовують хроматографічні методи, зокрема гель-фільтрацію (розділення за розміром молекул) (Kumar, & Tiwari, 2017).

Попередня десальтація є критичною умовою ефективною гель-фільтрації. Солі та низькомолекулярні домішки, що залишаються після культивування, можуть змінювати осмотичний тиск, електростатичні взаємодії та гідрофільність рухомої фази колонки, що негативно впливає на роздільну здатність і відтворюваність результатів. Видалення цих домішок на стадії ультрафільтрації забезпечує одержання фракцій з високою концентрацією галоцину та мінімальним фоновим шумом, що є ключовим для точного визначення біологічної активності та подальшого масштабування процесу (Kumar, & Tiwari, 2017).

Альтернативними методами остаточної очистки є іонообмінна хроматографія або зворотно-фазова HPLC. Іонообмінна хроматографія вимагає точного підбору буферів і контролю рН для збереження активності пептиду, тоді як RP-HPLC забезпечує високу роздільну здатність, але органічні розчинники можуть частково денатурувати термолабільний галоцин і обмежують

масштабування.

Висновки: гель-фільтрація після ультрафільтраційної десальтації є найбільш оптимальним методом остаточного очищення. Поєднання цих двох етапів забезпечує високу чистоту продукту, збереження його біологічної активності та створює передумови для успішного подальшого аналізу та застосування галоцину.

#### **6.1.5. Обґрунтування стадії сушіння та стабілізації галоцину**

Після стадії часткового очищення галоцин потребує переведення у стабільну суху форму для забезпечення тривалого зберігання, зручності транспортування та подальшого використання у дослідженнях чи технологічних процесах. Основними методами сушіння білкових та пептидних препаратів є ліофілізація, розпилювальна сушка та конвективне сушіння при контрольованих температурах.

Ліофілізація забезпечує високу стабільність продукту, оскільки вода видаляється при низьких температурах, зберігаючи структурну цілісність молекул. Це дозволяє максимально зберегти біологічну активність термолабільних пептидів. Проте для промислового масштабу ліофілізація є економічно та технологічно затратною через тривалий час процесу та значні енергетичні витрати (Карлаш, 2022).

Розпилювальна сушка дозволяє швидко отримати порошок і добре масштабується, але високі температури сушіння можуть перевищувати межу термостабільності продукту і спричинити часткову денатурацію галоцину (Карлаш, 2022).

Враховуючи, що наш галоцин зберігає біологічну активність при температурах до 80 °C (Kumar et al., 2011), оптимальним методом є конвективне сушіння при контрольованих температурах нижче 80 °C. Цей метод дозволяє одержати сухий продукт без істотної втрати активності, забезпечує економічну доцільність та простоту масштабування для промислового виробництва. У лабораторних умовах при потребі максимального збереження активності можна застосовувати ліофілізацію, але для великих обсягів виробництва конвективне

сушіння є найбільш раціональним методом (Карлаш, 2022).

Стадія сушіння забезпечує стабілізацію та зручність використання галоцину, а вибір конкретного методу ґрунтується на балансі між збереженням біологічної активності, економічною ефективністю та масштабованістю процесу. Для промисловості обираємо метод конвективного сушіння.

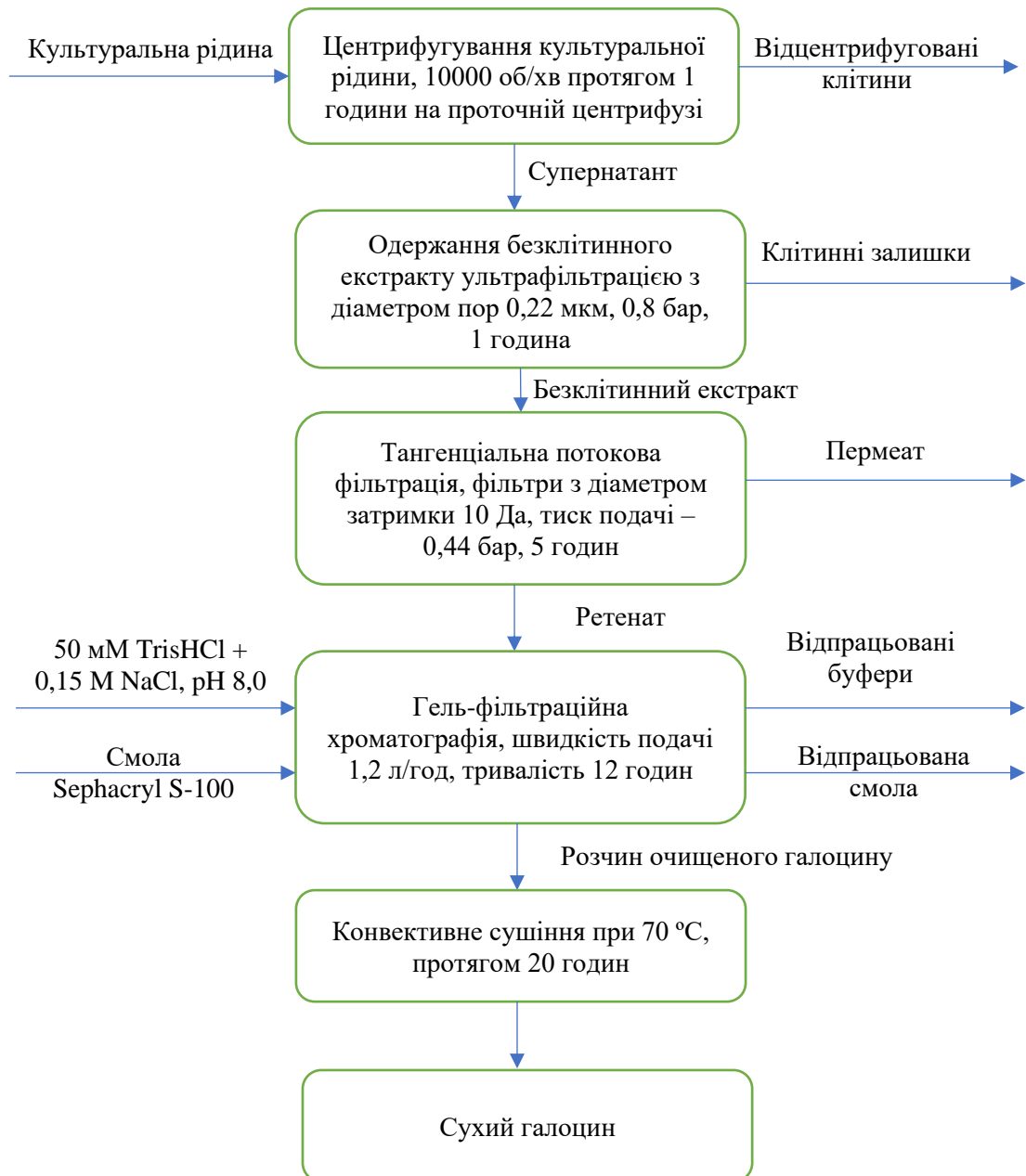


Рис.6.1. Узагальнена блок-схема очистки галоцину

## 6.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ( $V_{кр}$ ) = 530 л;

2. Концентрація біомаси *Haloferax volcanii* KPS1 в культуральній рідині ( $C_{біом}$ ) = 7,84 г/л (перерахунок з 70% можливої асиміляції вуглецю (див.п.1.3):  $5,6*0,7=3,92$ ;  $3,92/0,5=7,84$  г/л);

3. Концентрація галоцину в культуральній рідині ( $C_{галоцину}$ ) = 3,17 г/л (див.п.1.3);

3. Втрати на стадіях виділення і очищення = 40 %;

Теоретична кількість галоцину, яку можна отримати із 537,4 л культуральної рідини становить:  $530*3,17 \approx 1,68$  кг. Враховуючи 40% втрат на виділення і очищення бактеріоцину з культуральної рідини, отримаємо  $1,68*0,6 \approx 1$  кг галоцину. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

### Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 40 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 3 Зберігання культуральної рідини</b>						
1	Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	530 л	-	530 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 700 л
<b>ТП 4 Центрифугування культуральної рідини</b>						
2	Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	530 л	-	-	Проточна центрифуга продуктивністю 500-600 л/год
		Біомаса (враховуємо вологість АСБ – 5%, а вологість біомаси після центрифугування – 80%)	66,48 кг ( $7,84*80/5=125,44$ г/л вологої маси; $530*125,44=66,48$ кг)	-	66,48 кг	На знешкодження

Продовження табл.6.1.

		Супернатант	463,52 л (530-66,48=463,52)	5%	440,34 л (вміст галоцину: 1,68-5%≈1,6 кг)	До збірнику об'ємом 600 л
<b>ТП 5 Одержання безклітинного супернатанту шляхом фільтрації</b>						
3	Одержання безклітинного супернатанту шляхом фільтрації	Супернатант	440,34 л	-	-	На промисловій фільтраційній установці з керамічними фільтрами діаметром пор 0,4 мкм продуктивністю 500 л/год
		Клітинні залишки (припускаємо 10%)	44 кг	-	44 кг	На знешкодження
		Безклітинний супернатант	396,34 л (440,34-44=396,34 л)	2%	388,4 л (вміст галоцину: 1,68-7%≈1,56 кг)	До збірнику об'ємом 500 л
<b>ТП 6 Концентрування та десольфатація розчину галоцину ультрафільтрацією</b>						
4	Концентрування та десольфатація розчину галоцину ультрафільтрацією	Безклітинний супернатант	388,4 л	-	-	Ультрафільтраційна установка продуктивністю 400-500 л/год
		Пермеат	372,86 л	-	372,86 л	На знешкодження
		Ретентат (концентрований в 25 разів для досягнення концентрації ≈100 мг/мл галоцину)	15,54 л	8%	14,3 л (вміст галоцину: 1,68-15%≈1,43 кг)	До збірнику об'ємом 20 л

ТП 7 Хроматографічна очистка галоцину						
5	Хроматографічна очистка галоцину	Ретентат	15,54 л	-	-	На хроматографічну колонку об'ємом завантаження 20 л
		Буфер для врівноваження*	145 л	-	-	
		Смола Sephacryl S-100	15,54 кг	-	-	
		Буфер для елюювання*	31 л	-	-	
		Рідкі відходи	-	-	160,54 л	На знешкодження
		Відпрацьована смола	-	-	15,54 кг	На регенерацію
		Елюйований галоцин	31 л	20%	24,8 л (вміст галоцину: 1,68-35%≈1,09 кг)	До збірнику об'ємом 30 л
ТП 8 Сушіння очищеного галоцину						
6	Сушіння очищеного галоцину	Елюйований галоцин	31 л	-	-	В конвективній сушарці об'ємом завантаження 50 л
		Сухий галоцин	1,05	5%	1 кг	В скляну коричневу ємність об'ємом 1,5 л

**Примітка:** буфер для врівноваження та елюювання має однаковий склад – 50 мМ Tris-HCl, 0,15 М NaCl, pH 8,0

### 6.3. Специфікація обладнання

Таблиця 6.2.

#### Специфікація обладнання для виробництва субстанції галоцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
3-1 3-6 3-9 3-12	Збірник об'ємом 250 л	4	Стальний реактор-змішувач моделі МК-FYF-250. Об'єм апарату – 250 л. Швидкість обертів до 60 об/хв. Оснащений датчиками контролю рН та рівня рідини. Діаметр – 650 мм. Висота не вказана. <a href="https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/HfrpFuQOCqcB/China-250L-High-Temperature-High-Pressure-Stainless-Steel-Chemical-Reactor-with-Dual-Agitator.html">https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/HfrpFuQOCqcB/China-250L-High-Temperature-High-Pressure-Stainless-Steel-Chemical-Reactor-with-Dual-Agitator.html</a>

Продовження табл.6.2.

Д-2 Д-13	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор об'ємно-поршневого типу Н1-АРП-1М. Дозування до 1 л. Швидкість дозування до 6000/год. <a href="https://surl.lu/lrqajd">https://surl.lu/lrqajd</a>
Н-3 Н-7 Н-10 Н-14 Н-30	Насос перистальтичний	5	Перистальтичний насос ASP25/15IX. Продуктивність 385 л/год. Робочий тиск 10 бар. <a href="https://surl.lt/qlyekn">https://surl.lt/qlyekn</a>
Ф-4	Фільтр піщаний	1	Фільтр піщаний зі сталевим корпусом Aquarum BFH-1. Пропускна здатність до 1 м <sup>3</sup> год. Робочий тиск до 10 бар. <a href="https://surl.li/gxwxlb">https://surl.li/gxwxlb</a>
УЗ-5 УЗ-8	Установка зворотнього осмосу	2	Установка зворотнього осмосу ULP-RO2-4021. Продуктивність – 200 л/год. Габарити (мм): 500x350x1000. <a href="https://prom.ua/ua/p1606737286-promyshlennye-ustanovki-obratnogo.html">https://prom.ua/ua/p1606737286-promyshlennye-ustanovki-obratnogo.html</a>
Д-11 Д-27	Ваговий дозатор	2	Ваговий дозатор ФС-75. Діапазон зважувань 0,15-40 кг. Бункер об'ємом 75 л. Габарити (мм): 1160x730x2030. <a href="https://surli.cc/kytmj">https://surli.cc/kytmj</a>
З-15	Збірник об'ємом 700 л	1	Стальний реактор-змішувач моделі SO 700. Об'єм апарату – 700 л. Швидкість обертів до 940 об/хв. Оснащений подвійною сорочкою. Габарити (мм): 1200x500x2100. <a href="https://surl.lu/tkfqba">https://surl.lu/tkfqba</a>
Н-16 Н-19 Н-22	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос МР-1136-22. Продуктивність 630 л/год. Робочий тиск до 8 бар. <a href="https://surl.li/zohxjv">https://surl.li/zohxjv</a>
ПЦ-17	Центрифуга проточна	1	Центрифуга проточного типу моделі ТС-Q70 LAB. Максимальна швидкість ротора 19200 об/хв. Габарити (мм): 760x450x1125. <a href="https://surl.lu/vjugde">https://surl.lu/vjugde</a>
З-18	Збірник об'ємом 600 л	1	Стальний реактор-змішувач моделі 060С274. Об'єм апарату – 600 л. Оснащений сорочкою та мішалкою. Габарити (мм): 600x3700. <a href="https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/600-ltr-stainless-steel-reactor-060c274/">https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/600-ltr-stainless-steel-reactor-060c274/</a>
ФУ-20	Фільтраційна установка	1	Мікрофільтраційна установка СК-RO-0.5Т. Продуктивність – 500 л/год. На замовлення оснащена керамічними фільтрами з діаметром пор 0,4 мкм. <a href="https://surl.li/jczlsh">https://surl.li/jczlsh</a>

Продовження табл.6.2.

3-21	Збірник об'ємом 500 л	1	Стальний реактор-змішувач моделі МК-FYF-500. Об'єм апарату – 500 л. Швидкість обертів до 60 об/хв. Оснащений датчиками контролю рН та рівня рідини. Діаметр – 900 мм. Висота не вказана. <a href="https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/HfrpFuQOCqcB/China-250L-High-Temperature-High-Pressure-Stainless-Steel-Chemical-Reactor-with-Dual-Agitator.html">https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/HfrpFuQOCqcB/China-250L-High-Temperature-High-Pressure-Stainless-Steel-Chemical-Reactor-with-Dual-Agitator.html</a>
УУ-23	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка НУ-UFPh500L. Продуктивність – 500 л/год. Оснащений фільтрами з діаметром пор 10 кДа на замовлення. Габарити не наведено. <a href="https://www.hjwaterequipment.com/sale-53518271-500l-per-hour-ultrafiltration-unit-for-pharmaceutical-production.html">https://www.hjwaterequipment.com/sale-53518271-500l-per-hour-ultrafiltration-unit-for-pharmaceutical-production.html</a>
3-24	Збірник об'ємом 20 л	1	Стальний реактор-змішувач моделі LSR-20L. Об'єм апарату – 20 л. Оснащений сорочкою та мішалкою. Швидкість мішалки до 460 об/хв. Габарити (мм): 500x500x1850. <a href="https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/20l-double-layer-stainless-steel-chemical-reactor">https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/20l-double-layer-stainless-steel-chemical-reactor</a>
Н-25 Н-28	Перистальтичний насос	2	Перистальтичний насос Kronos. Продуктивність до 25 л/год. Робочий тиск до 4 бар. <a href="https://doznasos.com.ua/uk/katalog-produkcii/nasosy-do-zatory-2/peristaltichni-nasosy-do-zatory/seko-kronos-2/">https://doznasos.com.ua/uk/katalog-produkcii/nasosy-do-zatory-2/peristaltichni-nasosy-do-zatory/seko-kronos-2/</a>
ХК-26	Хроматографічна колонка	1	Хроматографічна колона МК-TSZ-30. Продуктивність – 30 л/год. Габарити (мм): 159x1950x500. Виконана з нержавіючої сталі. <a href="https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/efQUkHixabVj/China-30L-H-Stainless-Steel-Single-Column-Decolorization-Column-Solution-Ion-Exchange-Equipment.html">https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/efQUkHixabVj/China-30L-H-Stainless-Steel-Single-Column-Decolorization-Column-Solution-Ion-Exchange-Equipment.html</a>
3-29	Збірник об'ємом 35 л	1	Стальний реактор-змішувач. Об'єм апарату – 35 л. Оснащений сорочкою та мішалкою. Робочий тиск 4 атм. Габарити не наведено. <a href="https://khimmix.ua/en/himicheskie-reaktory/vakuumnyj-himicheskij-reaktor-35l">https://khimmix.ua/en/himicheskie-reaktory/vakuumnyj-himicheskij-reaktor-35l</a>

*Закінчення табл.6.2.*

КС-31	Конвективна сушарка	1	Сушарка конвективного типу TCF 50 PLUS. Робоча температура до 300 °С. Об'єм завантаження до 50 л. Габарити (мм): 690x635x570. <a href="https://www.chromservis.eu/ru/laboratory-drying-oven-tcf-50-plus-50-l-max-temp-300-c-air-forced-convection">https://www.chromservis.eu/ru/laboratory-drying-oven-tcf-50-plus-50-l-max-temp-300-c-air-forced-convection</a>
-------	---------------------	---	--

## РОЗДІЛ 7

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ ГАЛОЦИНУ

*ДР 1. Приготування води очищеної*

*ДР 1.1. Пом'якшення води питної*

У збірник (З-1) за допомогою дозатора (Д-2) виливають 180 л питної води. За допомогою технічних ваг зважують 540 г натрію карбонату, 30 г кальцій гідроксиду та 6 г натрій ортофосфату. Після цього вмикається мішалка і розчин інтенсивно перемішується протягом 10 хвилин. Потім, воду залишають на 30 хвилин для осадження домішок.

*ДР 1.2. Видалення домішок та знесолення води питної*

Через 30 хвилин в збірнику (З-1) вмикається мішалка на 5 хвилин, щоб підняти осад, що вже осів. Далі за допомогою перистальтичного насоса (Н-3) вода з осадом подається на піщаний фільтр (Ф-4), де більша частина осаду залишається, а очищена вода направляється до установки зворотного осмосу (УЗ-5) для подальшого знесолення. Процес очищення триває 30 хвилин. Очищена вода подається на тимчасове зберігання у збірник (З-6).

*ДР 1.3. Одержання води очищеної*

За допомогою перистальтичного насоса (Н-7) вода подається до установки зворотного осмосу (УЗ-8), де фільтри затримують залишкові домішки. Тривалість очищення становить 30 хвилин. Очищена вода подається на тимчасове зберігання у збірник (З-9) та подається на стадію ДР 2 за допомогою перистальтичного насоса (Н-10).

*ДР 2. Приготування буферів для врівноваження колонки та елюції галоцину*

На ваговому дозаторі (Д-11) зважують 1,41 кг комплексної солі Tris-HCl та 5,27 кг хлориду натрію. Наважки пересипаються до збірника (З-12) об'ємом

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 7</b> <b>ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ</b> <b>СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ</b> <b>СУБСТАНЦІЇ ГАЛОЦИНУ</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Шаульський В.О.</i>					90	123
<i>Перевір.</i>		<i>Буценко Л.М.</i>				<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

250 л. Об'ємно-ваговим дозатором (Д-13) доливають 173,3 л води очищеної від ДР 1.3. Вмикається перемішуючий пристрій для повного розчинення компонентів. Датчиком рівня рН контролюють рівень кислотності, який має становити  $8,0 \pm 0,1$ . Тривалість розмішування – 10 хвилин. Розчин поступово подається перистальтичним насосом (Н-14) до стадії ТП 7.

### *ТП 3. Зберігання культуральної рідини*

Культуральна рідина продуценту галоцину *Haloferax volcanii* KPS1 зберігається в збірнику (З-15) об'ємом 700 л при температурі  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Перистальтичним насосом (Н-16) культуральну рідину подають на наступну стадію.

### *ТП 4. Центрифугування культуральної рідини*

Культуральна рідина з минулої стадії передається до проточної центрифуги (ПЦ-17). Встановлюється швидкість обертів – 10000 об/хв. Тривалість процесу центрифугування становить близько 1 години. По завершенню процесу біомаса вручну вивантажується та передається на знешкодження, а супернатант відцентровими силами передається на зберігання до збірника (З-18) об'ємом 600 л.

### *ТП 5. Одержання безклітинного супернатанту шляхом фільтрації*

Зі збірника (З-18) в якому міститься супернатант перистальтичним насосом (Н-19) перекачують рідку фракцію на фільтраційну установку (ФУ-20) з керамічними фільтрами, діаметр пор яких становить 0,4 мкм для видалення клітинних залишків та вцілілих клітин. Тривалість процесу фільтрування становить близько 1 години. Тиск процесу – 0,8 бар. Пройдена рідина через фільтр вважається безклітинним супернатантом. Залишки, що залишилися на фільтрах промивають та передають на знешкодження. Самі керамічні фільтри піддають регенерації. Безклітинний супернатант передається до збірника (З-21) об'ємом 500 л.

### *ТП 6. Концентрування та десольватація розчину галоцину ультрафільтрацією*

Безклітинний супернатант за допомогою перистальтичного насосу (Н-22)

подається на ультрафільтраційну установку (УУ-23). Установка оснащена фільтрами з діаметром пор 10 кДа. Ступінь концентрування – 25 раз. Тривалість концентрування – близько 5 годин. Тиск процесу – 0,44 бар. Одержаний пермеат передається на знешкодження, а сам ретентат перекачується до збірника (З-24) об'ємом 20 л.

#### *ТП 7. Гель-фільтраційна хроматографія для очистки галоцину*

До хроматографічної колонки (ХК-26) за допомогою вагового дозатора (Д-27) вносять 15,54 кг смоли Sephacryl S-100. Далі, за допомогою перистальтичного насосу (Н-14) вносять буфер для врівноваження від ДР 2. Буфер подають до тих пір, поки на хроматограмі лінія контролю процесу не стане стало рівною (оскільки чітко неможливо сказати скільки буферу піде, використання об'ємно-вагового дозатора недоцільне, при цьому насоситься близько 145 л). Далі, за допомогою перистальтичного насосу (Н-25) наносять близько 15 л зразка, що містить галоцин (від ТП 6). Після нанесення, знову вмикаються перистальтичний насос (Н-14) та наносять буфер для елюції. Тривалість всього процесу близько 12 годин. Рідкі відходи передаються на утилізацію, а елюат за допомогою перистальтичного насосу (Н-28) подається до збірника (З-29) об'ємом 35 л.

#### *ТП 8. Сушіння очищеного галоцину*

Розчин очищеного галоцину з збірника (З-29) перистальтичним насосом (Н-30) розливається по деко для завантаження в конвективну сушарку (КС-31). Встановлюється температура сушіння в 70 °С. Тривалість сушіння – 20 годин. Наприкінці, сухий галоцин збирають вручну в скляну ємність з коричневого скла об'ємом 1,5 л, яка передається на склад. Подрібнення та просіювання не є обов'язковими стадіями, оскільки планується готувати рідкий препарат (передбачається подальша гомогенізація).

## РОЗДІЛ 8

### ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ СТОМАТОЛОГІЧНОГО ЛАКУ, ЩО МІСТИТЬ ГАЛОЦИН

#### 8.1. Обґрунтування вибору товарної форми випуску стоматологічного лаку, що містить галоцин

Розробка медичних виробів на основі бактеріоцинів архей потребує вибору такої форми, яка забезпечує стабільність пептиду, тривалу локальну дію та контакт із мікробною біоплівкою. У даній роботі обрано лак для зубів як оптимальну форму доставки галоцину. Вибір цієї форми зумовлений рядом технологічних, мікробіологічних та функціональних переваг.

##### 1. Локальна дія та мінімальна системна абсорбція

Галоцин — білковий антимікробний агент, дія якого спрямована безпосередньо на мікроорганізми ротової порожнини (стрептококи карієсу, актиноміцети, бактерії, що формують зубну біоплівку). Використання лаку дозволяє створити місцевий депо-ефект, коли активна речовина залишається у зоні нанесення значно довше, ніж при застосуванні гелю, ополіскувачів або паст (Darbandi et al., 2022). Оскільки бактеріоцин не потребує системної дії і небажана його деградація в шлунково-кишковому тракті, локальна форма нанесення є найбільш раціональною.

##### 2. Пролонговане вивільнення активної речовини

Лаки для зубів утворюють на емалі тонку полімерну плівку, яка поступово віддає активні компоненти (Augusto et al., 2022). Для галоцину це важливо, оскільки:

- пептид має обмежену стабільність у водному середовищі;
- пролонговане вивільнення знижує потребу у частому нанесенні;
- тривалий контакт із біоплівкою підвищує ефективність проти бактерій, які повільно ростуть або глибоко вбудовані в структуру нальоту.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 8 ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ СТОМАТОЛОГІЧНОГО ЛАКУ, ЩО МІСТИТЬ ГАЛОЦИН</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архівів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Шаульський В.О.</i>						92	123
<i>Перевір.</i>	<i>Буценко Л.М.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Лак забезпечує перебування активної молекули на поверхні зуба впродовж 8–24 годин, залежно від складу полімеру.

### 3. Стабілізація пептидної молекули у полімерному середовищі

Бактеріоцини, включно з галоцинами, чутливі до (Darbandi et al., 2022):

- протеаз;
- коливань рН;
- нагрівання;
- надлишкової вологості.

Полімерні лакові основи (шелак, поліакрилати, етилацетатні чи етанольні розчини) створюють маловодне середовище (Qussi, & Suess, 2006), яке підвищує стабільність пептиду. Включення галоцину до лаку дозволяє уникнути швидкої деградації, характерної для водних розчинів, спреїв або ополіскувачів.

### 4. Висока адгезія до емалі та біоплівки

Завдяки плівкоутворенню лак закріплюється на емалі навіть у присутності слини (Qussi, & Suess, 2006). Це важливо для галоцину, оскільки його дія спрямована на бактерії у складі біоплівки, а не лише на вільні клітини. Лак дає можливість (Qussi, & Suess, 2006):

- фіксувати молекулу на місці нанесення;
- контактувати з твердою поверхнею зуба;
- забезпечувати поступову дифузю антимікробного пептиду.

### 5. Точність дозування та контроль місця нанесення

Лак наноситься локально стоматологом або користувачем — точково на поверхні зубів або у зонах підвищеного ризику формування карієсогенної біоплівки. Така форма мінімізує можливий вплив на нормальну мікрофлору ротової порожнини, що важливо при використанні антимікробних пептидів у складі медичного виробу (Costa, Puppin-Rontani, & de Castilho, 2025).

## Порівняння з альтернативними формами

Альтернативна форма	Переваги	Недоліки (чому не підходить для галоцину)
Гель	Легко наносити; хороша в'язкість	Швидке змивання слиною; короткий час дії; водна основа → низька стабільність пептиду
Ополіскувач / розчин	Простий у застосуванні	Вкрай короткий контакт (секунди), сильне розведення діючої речовини; нестабільність пептиду у воді
Спрей	Зручність	Немає плівкоутворення; нестабільність у рідкій фазі; неконтрольований розподіл
Паста / порошок	Поширені форми	Контакт $\leq 1-2$ хвилини; відсутність пролонгованої дії; пептиди нестійкі в абразивних середовищах
Полімерні смужки / пластирі	Тривалий контакт	Складні у виробництві; можливий дискомфорт; потребують точного моделювання форми та кріплення

**Примітка:** таблиця складена автором самостійно

У порівнянні з альтернативами лакова форма має найкращий баланс між стабільністю, тривалою дією та простотою застосування.

Лак для зубів є оптимальною формою доставки галоцину, оскільки забезпечує стабільність пептидної молекули, довготривалу локальну дію, зручність нанесення, високу адгезію до емалі та можливість створення контрольованого депо активної речовини. Порівняно з альтернативними формами лак демонструє найкращі технологічні й фармакологічні показники для антимікробних пептидів архей, що робить його логічним вибором для розробки нового стоматологічного засобу з бактеріоциновою активністю.

Для забезпечення ефективної антимікробної дії та стабільності галоцину у лаку для зубів був розроблений наступний склад (<https://www.safcodental.com/media/catalog/SDS/%243070053.pdf>), який поєднує полімерну основу, розчинник, пластифікатори та допоміжні стабілізатори.

Галоцин використаний як основний активний компонент, що забезпечує специфічну протимікробну дію проти *Streptococcus mutans* та інших бактерій, які формують зубну біоплівку. Концентрація галоцину в одній дозі (2,1 мг на 0,25 г лаку, ~0,84 % маси) достатня для створення локального депо-ефекту на емалі та забезпечує пролонговане вивільнення активної речовини (Kavitha, Lipton, Sarika,

& Aishwarya, 2011).

Тимол залишено як допоміжний компонент для покращення смаку, легкого антисептичного ефекту та додаткової стабілізації лаку (<https://www.safcodental.com/media/catalog/SDS/%243070053.pdf>).

Плівкоутворюючі полімери (акрилатно-вінілацетатний кополімер і шелак) забезпечують адгезію до емалі, утворення тонкої стійкої плівки та контрольоване поступове вивільнення галоцину протягом 8–24 годин (<https://www.safcodental.com/media/catalog/SDS/%243070053.pdf>).

Етиловий спирт виконує роль розчинника полімерної матриці та активної речовини, забезпечуючи рівномірне нанесення лаку та швидке висихання після аплікації (<https://www.safcodental.com/media/catalog/SDS/%243070053.pdf>).

Гліцерин як пластифікатор покращує еластичність плівки, запобігаючи її крихкості та відшаруванню (Park, & Lee, 2011).

Буферні солі та антиоксиданти підтримують стабільний рН і захищають пептид від окислення та деградації під час зберігання та експлуатації (Johnsen, Fimland, Eijsink, & Nissen-Meyer, 2000).

Таблиця 8.2

### Склад лаку для зубів з галоцином

Компонент	Кількість на 0,25 г лаку	Масова частка, %	Призначення
Галоцин	2,1 мг (120 Од)	0,84 %	Активна антимікробна речовина проти <i>S. mutans</i>
Тимол	2,5 мг	1,0 %	Допоміжна антимікробна та стабілізуюча речовина, аромат
Акрилатно-вінілацетатний кополімер	75 мг	30 %	Плівкоутворювач, забезпечує адгезію та пролонговане вивільнення
Шелак	50 мг	20 %	Плівкоутворювач, стабілізація активного пептиду
Етиловий спирт (розчинник)	100 мг	40 %	Розчинник полімерів і активної речовини, забезпечує нанесення
Гліцерин (пластифікатор)	5 мг	2 %	Забезпечує гнучкість плівки, уникнення крихкості
Буферні солі (фосфати)	2,5 мг	1 %	Підтримка стабільного рН для галоцину
Антиоксидант (аскорбінова кислота)	1 мг	0,4 %	Запобігання окисленню та деградації пептиду

Вибір цього складу дозволяє поєднати максимальну антимікробну активність галоцину, пролонговане локальне вивільнення та стабільність пептиду, а також комфортне і точне нанесення лаку на емаль зубів, що робить його ефективним медичним виробом для профілактики карієсу.

Для забезпечення зручності застосування та контролю дози лаку вибрано індивідуальні порційні упаковки по 0,25 г (<https://tsdental.com.ua/ru/shop/ivoclar/care/cervitec/cervitec-plus-single-dose-assortment-20>). Такий формат дозволяє точно дозувати галоцин, мінімізуючи ризик передозування або нерівномірного нанесення, а також зберігати стабільність активного пептиду до моменту використання.

За зразком Cervitec Plus®, кожна доза лаку містить власну аплікаційну щіточку, що дозволяє наносити препарат без додаткового обладнання та підвищує гігієнічність процедури. Окремі порції лаку забезпечують індивідуальне використання, зменшуючи контакт з повітрям і вологістю, що додатково захищає галоцин від деградації (<https://tsdental.com.ua/ru/shop/ivoclar/care/cervitec/cervitec-plus-single-dose-assortment-20>).

Таке рішення робить продукт зручним для пацієнта та практичним для стоматолога, забезпечує точне локальне нанесення на зони підвищеного ризику карієсу та відповідає вимогам сучасних медичних виробів для профілактики стоматологічних захворювань.

Виробництво лаку для зубів з галоцином, який належить до медичних виробів, що контактують зі слизовою рота, потребує забезпечення контролю мікробного навантаження та стабільності пептиду. Для критичних етапів виробництва — дозування галоцину в лак і фасування у порційні індивідуальні упаковки — доцільно застосовувати приміщення ISO Class 7 (GMP клас C). Допоміжні операції, такі як підготовка матеріалів і контрольне пакування, можна проводити у приміщенні ISO Class 8 (GMP клас D) (<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>).

Для приготування лаку слід використовувати очищену воду, яка відповідає вимогам для медичних виробів (не менше якості, ніж вода очищена за Ph. Eur.), але не обов'язково води для ін'єкцій. Використання очищеної води забезпечує стабільність пептиду та відсутність додаткового мікробного забруднення, необхідного для підтримки стерильності продукту (<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1785/voda-ochishhena>).

Таке поєднання контролю чистоти приміщень і якості води гарантує безпечне та ефективне виробництво лаку для профілактики карієсу.

## 8.2. Специфікація обладнання

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведено у табл. 8.3.

Таблиця 8.3.

### Специфікація обладнання на виробництво стоматологічного лаку

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник виконаний з нержавіючої сталі та оснащений металевою сіткою.
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G4. Клас очистки G4. Габарити (мм): 592x592x48 <sup>1</sup>
В-3	Вентилятор	1	Промисловий вентилятор ВР 287-46. Продуктивність 750 м <sup>3</sup> /год. Габарити (мм): 414 X 473 X 470 <sup>2</sup>
К-4	Електрокалорифер	1	Електрокалорифер ЕТП-10. Продуктивність 900 м <sup>3</sup> /год. Габарити (мм): 370x450x380 <sup>3</sup>
П-5	Парозволожувач	1	Парозволожувач УТ-НР80.0L. Продуктивність 650 м <sup>3</sup> /год. Габарити (мм): 840x620x810 <sup>4</sup>
Ф-6	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтр касетний. Клас очистки F9. Габарити (мм): 592 x 592 x 292 <sup>5</sup>
3-7 3-12 3-15 3-18 3-22	Збірник об'ємом 100 л	5	Збірник сталевий LSR-100L. Об'єм – 100 л. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Габарити (мм): 690x690x2350 <sup>6</sup>

Закінчення табл.8.3.

Д-8 Д-17 Д-19 Д-21 Д-24	Дозатор рідинний	5	Дозатор рідин. Продуктивність до 3 т/год. Дискретність 5 г. Габарити не наведено <sup>7</sup>
Н-9 Н-13 Н-16 Н-20 Н-25	Перистальтичний насос	5	Перистальтичний насос IPS200. Продуктивність 200 л/год. Габарити (мм): 85x125x105 <sup>8</sup>
Ф-10	Піщаний фільтр	1	Піщаний фільтр UF-160B. Продуктивність 100 л/год. Габарити (мм): 970x160x160 <sup>9</sup>
З-11 З-14	Зворотній осмос	2	Установка зворотнього осмосу ULP-RO2-4021. Продуктивність 200 л/год. Габарити (мм): 500x350x1000 <sup>10</sup>
Д-23	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ВДСВ-4. Дозування до 50 кг. Габарити (мм): 930x930x1780 <sup>11</sup>
РЛ-26	Розливочна лінія	1	Розливочна лінія ZS-DTPP100C. Розливає по флаконам об'ємом від 0,1 мл. Продуктивність 700 мл/хв. Габарити (мм): 655 × 160 × 185 <sup>12</sup>
АЛП-27	Автоматизована лінія по упаковці препаратів	1	Автоматизована лінія по упаковці препаратів РТС 200. Продуктивність 200 упаковок/хв. Габарити не наведено <sup>13</sup>
КМ-28	Картонажна машина	1	Картонажна машина MF CUBE. Продуктивність – 12 групових коробок/хв. Габарити не наведено <sup>14</sup>

Примітка: 1 - <https://ccktm.com.ua/ua/p852080152-filtr-592x592x48.html>, 2 - <https://www.vent.com.ua/ventilyator-vr-287-46-25-vc-14-46-25-nzh-ehldv-0371500/>, 3 - [https://unitech-clima.com.ua/kataloh/zvolozhuvach-povitria/](https://turbovent.com.ua/ua/p1742205553-promyshlennyj-elektricheskij-teploventilyator.html?source=merchant+center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=19682279720&utm_network=x&utm_adposition=&utm_device=c&utm_matchtype=&utm_target=&utm_group=&utm_term=&gad_source=1&gad_campaignid=19674346707&gbraid=0AAA AACmQt_ndqGAhdNzpeT61bzOaoaglb&gclid=Cj0KCQiAiebIBhDmARIsAE8PGNLQO6byVZX 1n3F_vuogDmbUzKuCsJsqnIvnUv1h6HCpLBnfCgiykQoaAu1JEALw_wcB</a>, 4 - <a href=), 5 - <https://ventfilter.kiev.ua/ru/goods/filtr-vozdushniy-kassetniy-klass-filtratsii-f9-4734858/>, 6 - <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/100l-large-industrial-jacketed-stainless-steel-reactor>, 7 - <https://technowagy.com.ua/products/dozator-ridyn/>, 8 - [https://vroda.co.ua/ua/product/himichniiy-nasos--peristaltichniiy-ips200-200-lgod-24vdc-1ba\\_15124029224](https://vroda.co.ua/ua/product/himichniiy-nasos--peristaltichniiy-ips200-200-lgod-24vdc-1ba_15124029224), 9 - [https://www.alibaba.com/product-detail/UF-160B-Water-Purifier-Water-System\\_1600925385144.html?spm=a2700.7724857.0.0.432e5d0dxvJA2u](https://www.alibaba.com/product-detail/UF-160B-Water-Purifier-Water-System_1600925385144.html?spm=a2700.7724857.0.0.432e5d0dxvJA2u), 10 - [https://abctech.com.ua/ua/p1160563245-vesovoj-dozator-dlya.html](https://prom.ua/p1606737286-promyshlennye-ustanovki-obratnogo.html?utm_source=google+product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gad_campaignid=20983226771&gbraid=0AAAAADB xJSU4xJhSe6mjfB16VqP-TImKo&gclid=Cj0KCQiAiebIBhDmARIsAE8PGNL0PCG91JvoW55JJRmVPRLs6RuLU1dd10x M006hLhfafd JGAEIqoAaAlyaEALw_wcB</a>, 11 - <a href=), 12 - <https://www.zonesun.com/uk/products/zs-dtpp100c-intelligent-single-head->

### **8.3. Опис технологічного процесу**

#### *ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря*

##### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря подається через повітрозабірник (ПЗ-1), розташований на висоті близько 15 м від рівня криші виробничого приміщення. Таке розташування мінімізує потрапляння пилу та мікробіологічних домішок у систему.

##### *ДР 1.2. Перша стадія очищення повітря*

Повітря проходить через фільтр грубої очистки (Ф-2), який затримує частки розміром 5–10 мкм. Далі воно надходить у вентилятор (В-3), що підтримує необхідний тиск у системі. Потік повітря стабілізується в електрокалорифері (К-4) при температурі 20–25 °С і обробляється у парозволожувачі (П-5) для підтримання вологості на рівні 60 %.

##### *ДР 1.3. Друга стадія очищення повітря*

Після зволоження повітря спрямовується на фільтр тонкої очистки (Ф-6), який затримує частки розміром 0,3–0,5 мкм. Ефективність фільтрації на цьому етапі забезпечує до 99,97 % очищення, що відповідає вимогам для приміщень класу чистоти С.

#### *ДР 2. Підготовка очищеної води*

##### *ДР 2.1. Пом'якшення водопровідної води*

У збірник (З-7) через дозатор (Д-8) подають водопровідну воду в об'ємі 50 л. У окремій операції на технічних вагах відмірюють реагенти: 7,2 кг натрій карбонат, 384 г кальцій гідроксид та 48 г натрій ортофосфат у відповідних кількостях. Після внесення речовин у воду суміш перемішують мішалкою протягом 10 хв, а потім залишають на 30 хв для утворення осаду, що зменшує жорсткість води.

##### *ДР 2.2. Видалення осаду та знесолення*

Через пів години процес перемішування повторюють протягом 5 хв для підйому осаду. Отриману суспензію за допомогою насоса (Н-9) подають на піщаний фільтр (Ф-10), де відділяються тверді домішки. Потім вода проходить через систему зворотного осмосу (З-11) для часткового знесолення. Очищена рідина накопичується у резервуарі (З-12).

#### *ДР 2.3. Отримання очищеної води*

З резервуара вода насосом (Н-13) подається на додаткову систему зворотного осмосу (З-14) для видалення залишкових домішок. Після цього очищена вода збирається у збірнику (З-15) та готова до використання при приготуванні лаку. Використання такої очищеної води забезпечує стабільність галоцину та відповідає вимогам медичних виробів. Вода подається до ДР 3 за допомогою перистальтичного насосу (Н-16)

#### *ДР 3. Приготування 80-% розчину етанолу*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-17) до збірника (З-18) наливають 41,6 л 96-% етанолу. Далі, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-19) доливають 8,4 л води очищеної від ДР 2.3. Вмикається мішалка на протязі 30 хвилин для одержання концентрації етанольного розчину в 80-%, який перевіряють ареометром. Розчин передають на наступну стадію за допомогою перистальтичного насосу (Н-20)

#### *ТП 4. Приготування лаку для профілактики карієсу*

##### *ТП 4.1. Розчинення плівкоутворювачів*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-21) до збірника (З-22) наливають 47,61 л 80-% розчину етанолу від ДР3. На ваговому дозаторі (Д-23) зважують 35,71 кг акрилатно-вінілацетатного кополімеру та 23,8 кг шелаку, які вносять в збірник (З-22). Вмикається мішалка для повного розчинення полімерів.

##### *ТП 4.2. Додавання пластифікатору та стабілізаторів*

На технічних вагах зважують 1,18 кг готовий порошок PBS (фосфатний буфер) та 0,48 кг аскорбінової кислоти. На об'ємно-ваговому дозаторі (Д-24) зважують 2,38 кг гліцерину. Наваржки вносяться в однорідний розчин з плівкоутворювачами до збірника (З-22). Вмикається мішалка для повного

розчинення компонентів.

#### *ТП 4.3. Внесення діючих речовин*

На технічних вагах зважують 1 кг галоцину та 1,18 кг тимолу. Наважки вносять до збірнику (З-22). Вмикається мішалка для повного розчинення компонентів. Розчин подається на лінію розливу за допомогою перистальтичного насосу (Н-25).

#### *ТП 5. Розлив лаку по дозованим формам*

Розчин від ТП 4.3. подається до розливної лінії (РЛ-26). Роботизований конвеєр, тримаючи форми для заповнення (подібні до епендорфів), підносить їх до сопла, що дозує готовий препарат по 0,25 г в кожену форму, після чого кришка закривається та запаюється поліетиленовою стрічкою. Готові форми конвеєром подаються до наступного етапу на комплектування, складання та упакування в групову тару. Кількість заповнених флаконів на стадії має становити 4 746 784 штук. Тривалість операції – 5 годин.

#### *ПМФ 6. Пакування, маркування та фасування готового препарату*

##### *ПМФ 6.1. Пакування форм в підставки та в коробки*

Конвеєром форми потрапляють до автоматизованої лінії по упаковці препаратів (АЛП-27). Одержані флакони вставляють в картонну підставку в кількості 10 штук, а потім, вкладаються в складену коробку разом з індивідуальними шіточками-аплікаторами для нанесення, які знаходяться в пластикових лотках та запаковані зверху поліетиленовою плівкою. До коробок також вкладається інструкція до застосування медичного виробу. Складені коробки передаються конвеєром до наступної стадії. Кількість коробок – 474 678 шт. Тривалість операції – 5 годин.

##### *ПМФ 6.2. Пакування в групову тару*

Коробки конвеєром потрапляють до картонажної машини (КМ-28) де пакуються по 100 штук на 1 коробку. Тривалість операції – 7 годин. Кількість групових коробок становить 4747 шт. На коробку наноситься серія та дата виготовлення препарату.

## РОЗДІЛ 9

### КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

#### 9.1. Контроль субстанції

Контроль виробництва готової субстанції (порошку) галоцину спрямований на забезпечення відповідності кожної серії встановленим специфікаціям щодо ідентичності, чистоти, біологічної активності, фізико-хімічних властивостей і мікробіологічної безпеки. Система контролю повинна базуватися на задокументованих стандартних операційних процедурах (SOP), валідації аналітичних методик, веденні пакету виробничо-контрольної документації (batch record) і схемі випуску/утилізації невідповідних серій.

##### 1. Зовнішній вигляд

Визначається візуально при денному світлі на фоні білого аркуша паперу. Оцінюють колір, однорідність та наявність сторонніх частинок. Субстанція повинна являти собою порошок білого або кремового відтінку, без сторонніх включень і ознак зволоження. Для забезпечення об'єктивності допускається використання стереомікроскопа для виявлення мікрочастинок.

##### 2. Ідентичність і чистота

Ідентичність білкової субстанції підтверджується методом електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE). Зразок розчиняють у денатурувальному буфері з SDS і  $\beta$ -меркаптоетанолом, інкубують при 95 °C протягом 5 хв, після чого наносять на гель. Електрофорез проводять у стандартних умовах (12–15% поліакриламідний гель). Виявлення білкових смуг здійснюють фарбуванням Coomassie Brilliant Blue або срібленням. Ідентичність встановлюють за положенням основної смуги, яке відповідає молекулярній масі галоцину (близько 14 кДа). Оцінка чистоти виконується за співвідношенням площі основної смуги до сумарної площі всіх смуг; для фармацевтичної субстанції рівень чистоти повинен перевищувати 90–95%. За необхідності

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Шаульський В.О.</i>			<b>РОЗДІЛ 9 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архівів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Буценко Л.М.</i>					102	123
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

додатково проводять вестерн-блотинг із використанням антитіл проти галоцину (Martínez-Espinosa, 2024).

### 3. Питома активність

Біологічну активність визначають методом агар-дифузійного аналізу (AWDA, agar well diffusion assay). Готують агарове середовище з тест-культурою, чутливою до галоцину (наприклад, представник *Streptomyces* або *Bacillus*). У лунки в агарі вносять серії розведень досліджуваного препарату та стандартного зразка. Після інкубації при оптимальній температурі вимірюють діаметр зон інгібування росту. На основі калібрувальної кривої, побудованої для стандарту, визначають активність у зразках. Результати виражають у одиницях активності на міліграм білка (AU/мг) (Kavitha et al., 2011).

### 4. Вологість

Визначення залишкової вологи у субстанції галоцину проводять за методом Карла Фішера, який ґрунтується на кількісній реакції води з йодом у присутності діоксиду сірки та основи (піридину або імідазолу) в безводному середовищі метанолу. Для аналізу зразок (10–50 мг субстанції) розчиняють у відповідному розчиннику (наприклад, метанолі або суміші метанолу з диметилформамідом для кращого розчинення білка) та вводять у титратор Карла Фішера.

При кулонометричному методі вода в зразку реагує зі свіжоутвореним йодом, який генерується електролітично, і споживання електрики пропорційне кількості води. В результаті вимірюється точна кількість вологи, що виражається у відсотках від маси субстанції.

Метод Карла Фішера є більш точним і чутливим у порівнянні з класичним висушуванням у шафі, дозволяє визначати навіть дуже низький вміст вологи (до 0,01%). Для білкових препаратів цей метод є рекомендованим фармакопеями, оскільки він не призводить до деградації термолабільних речовин і не спотворює результатів за рахунок втрати летких компонентів ([https://jpdbs.nihs.go.jp/jp14e/14data/General\\_Test/Water\\_Determination\\_\(Karl\\_F.pdf\)](https://jpdbs.nihs.go.jp/jp14e/14data/General_Test/Water_Determination_(Karl_F.pdf))).

Норма вологи для сухої субстанції галоцину має бути не більше 3–5%.

## 9.2. Методи контролю стоматологічного лаку

Аналітично-нормативна документація поширюється на лак для зубів з галоцином. Препарат являє собою прозору рідку суспензію для нанесення на зубну поверхню.

Склад 0,25 г лаку:

- Галоцин – 2,1 мг (0,84 %) – активна антимікробна речовина проти *S. mutans*
- Тимол – 2,5 мг (1 %) – допоміжна антимікробна речовина, аромат
- Акрилатно-вінілацетатний кополімер – 75 мг (30 %) – плівкоутворювач
- Шелак – 50 мг (20 %) – плівкоутворювач, стабілізація активного пептиду
- Етиловий спирт – 100 мг (40 %) – розчинник
- Гліцерин – 5 мг (2 %) – пластифікатор
- Буферні солі (фосфати) – 2,5 мг (1 %) – підтримка рН
- Антиоксидант (аскорбінова кислота) – 1 мг (0,4 %)

Форма випуску: форми по 0,25 г препарату в кожній №10

Таблиця 9.1.

### Специфікація методів контролю на медичний виріб лаку для зубів

Показник	Допустимі межі	Метод контролю
Зовнішній вигляд	Прозорий, без осаду і сторонніх включень	Візуально, п. 2.2.2 ДФУ
Прозорість	Має бути прозорим	Візуально, п. 2.2.2 ДФУ
рН	6,5–7,5	Потенціометрія, п. 2.2.3 ДФУ
Об'єм флакону	≥ 0,25 г	Градуваний циліндр, п. 2.2.1 ДФУ
Вміст галоцину	2,1 мг/0,25 г	Спектрофотометрія / Хроматографія, п. 2.9.17 ДФУ
Мікробіологічна чистота	Відповідно до ДФУ/ЄФ	Метод посіву на поживні середовища, п. 2.6.13 ДФУ
Механічні включення	Видимі – практично відсутні; невидимі – ≤25/мл (≥10 мкм), ≤3/мл (≥25 мкм)	Світлоблокування, автоматизований підрахунок, п. 2.9.19–2.9.20 ДФУ

## Методи контролю

1. Зовнішній вигляд ([https://moz.gov.ua/uploads/11/55680-dn\\_754\\_02052024\\_dod\\_2.pdf](https://moz.gov.ua/uploads/11/55680-dn_754_02052024_dod_2.pdf))

Візуальна оцінка: лак має бути прозорим, без осаду та сторонніх включень. Контроль здійснюють на прозорому фоні при природному або білому освітленні (ДФУ, п. 2.2.2).

2. Прозорість ([https://moz.gov.ua/uploads/11/55680-dn\\_754\\_02052024\\_dod\\_2.pdf](https://moz.gov.ua/uploads/11/55680-dn_754_02052024_dod_2.pdf))

Візуальна перевірка на світлому фоні. Розчин має бути прозорим, без каламуті (ДФУ, п. 2.2.2).

3. pH (<https://resource.odmu.edu.ua/chair/download/133396/8e5jKO8jRTCQxgSpdmmaB/A/%D0%94%D0%A4%D0%A3%20%D1%874.pdf>)

Вимірюють потенціометрично за допомогою рН-метра. Перед аналізом проводять калібрування з буферними стандартами рН 4,01; 7,01; 10,01. Допустимий діапазон рН: 6,5–7,5 (ДФУ, п. 2.2.3).

4. Об'єм флакону ([https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn\\_1005\\_20062025\\_dod.pdf](https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn_1005_20062025_dod.pdf))

Визначення проводять за допомогою градуйованого скляного циліндра відповідної точності. Флакон заповнюють лаком до номінальної позначки. Для контролю об'єму відбирають не менше 10 флаконів із серії та вимірюють об'єм рідини в кожному циліндрі. Результат випробувань вважається прийнятним, якщо об'єм у кожному флаконі не менше номінального – 0,25 г (ДФУ, п. 2.2.1).

5. Вміст галоцину ([https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn\\_1005\\_20062025\\_dod.pdf](https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn_1005_20062025_dod.pdf))

Кількісний аналіз проводять методом спектрофотометрії або хроматографії. Для цього відбирають пробу лаку з флакона, розчиняють у відповідному розчиннику та доводять до визначеного об'єму. Вимірювання здійснюють при відповідній довжині хвилі або налаштуваннях хроматографа згідно методики (ДФУ, п. 2.9.17). Показник вмісту галоцину повинен відповідати

номінальному значенню  $\pm 5\%$ . Результати контролю оформлюють у вигляді середнього значення та стандартного відхилення за серію флаконів.

6. Мікробіологічна чистота ([https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn\\_1005\\_20062025\\_dod.pdf](https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn_1005_20062025_dod.pdf))

Контроль здійснюють методом посіву на поживні середовища для бактерій та грибів (ДФУ, п. 2.6.13). Відбирають пробу лаку з флакона, розводять у стерильному розчиннику та висівають на відповідні поживні середовища:

Для аеробних бактерій – на соєво-казеїнове середовище;

Для грибів та дріжджів – на Sabouraud середовище;

Для анаеробних бактерій – на рідке тіогліколеве середовище.

Інкубацію проводять при відповідних умовах температури та часу, рекомендованих ДФУ. Допустимі значення мікроорганізмів встановлюють відповідно до вимог до стоматологічних лаків:

Кількість колоній аеробних бактерій – не більше встановленої норми;

Кількість дріжджів і пліснявих грибів – не більше допустимого значення;

Лак вважається придатним, якщо не перевищено допустимі показники мікроорганізмів, тобто невелика кількість природної мікрофлори допускається.

7. Механічні включення ([https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn\\_1005\\_20062025\\_dod.pdf](https://moz.gov.ua/storage/uploads/8a678585-1d8a-43b4-8902-187b4d9756d9/dn_1005_20062025_dod.pdf))

Видимі частинки: оцінюють візуально на прозорому та чорному фоні при природному та направленому освітленні. Лак має бути прозорим, без осаду та сторонніх частинок. Допустимо – практично відсутні (менше 2 частинок із 20 флаконів).

Невидимі частинки: контроль проводять методом світлоблокування та автоматизованим підрахунком кількості і розміру частинок. Допустимо –  $\leq 25$  частинок  $\geq 10$  мкм/мл та  $\leq 3$  частинки  $\geq 25$  мкм/мл (ДФУ, п. 2.9.19–2.9.20).

Результати контролю механічних включень оформлюють у вигляді таблиці середнього значення частинок на мілілітр із серії флаконів та стандартного відхилення.

Пакування та маркування. Форми в картонній підставці з індивідуальною

щіточкою-аплікатором у картонній пачці з інформацією про склад, спосіб застосування, умови зберігання, термін придатності та серію виробництва.

Умови зберігання:  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$  –  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , відносна вологість  $\leq 75\%$ , у недоступному для дітей місці.

Термін придатності: 36 місяців до відкриття; 6 місяців після відкриття.

## РОЗДІЛ 10

### ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ СТОМАТОЛОГІЧНОГО ЛАКУ

#### 10.1. Галузь і застосування корисної моделі

Корисна модель належить до галузі фармації, стоматології та біотехнології, зокрема до засобів локальної профілактики карієсу та лікування мікробних уражень емалі. Вона стосується створення стоматологічного зубного лаку пролонгованої дії, що містить антимікробний пептид галоцин KPS1, стабілізований у полімерній основі з малим вмістом води. Розроблений засіб призначений для пригнічення росту *S. mutans* — ключового карієсогенного мікроорганізму, а також для зниження біоплівкоутворення у ротовій порожнині.

Застосовувати стоматологічний лак можна у клінічній практиці стоматологів, у профілактичних програмах, а також у вигляді індивідуальних доз одноразового нанесення. Завдяки пролонгованому вивільненню він забезпечує тривалий контакт активної речовини з поверхнею зубів і може бути використаний як основний або додатковий засіб у протикарієсній терапії.

#### 9.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки

На сучасному фармацевтичному ринку представлені полімерні лаки для зубів, що містять фтор або антисептики. Одним із найбільш розповсюджених засобів є Cervitec Plus®, який містить хлоргексидин диглюконат (0,3%) та тимол (0,5). Іншим відомим продуктом є Fluor Protector®, який містить фтор у концентрації 0,1% та формує прозору еластичну плівку. Ці засоби демонструють доказову ефективність щодо ремінералізації або зниження бактеріального навантаження.

Втім, попри широке застосування аналогів, вони мають низку істотних недоліків. Жоден із них не містить пептидних антимікробних агентів, здатних

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шаульський В.О.			РОЗДІЛ 10 ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ СТОМАТОЛОГІЧНОГО ЛАКУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					108	123
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

специфічно впливати на *S. mutans* у складі біоплівки. Хлоргексидин та інші антисептики демонструють тимчасову активність, тоді як карієсогенні бактерії швидко відновлюють популяцію. Активні молекули в існуючих лаках або нестабільні у водному середовищі, або не забезпечують тривалого вивільнення. Більшість водних або напівводних форм не можуть захистити білкові молекули від руйнування протеазами, коливаннями рН та впливом слини.

Аналоги не вирішують ключової проблеми — відсутності селективного, тривалого та стабільного антимікробного чинника проти *S. mutans*. Жоден із відомих лаків не використовує галоцин KPS1, молекулу архей з доведеною активністю проти карієсогенних мікроорганізмів.

### **10.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення**

Задачею, на вирішення якої спрямована корисна модель, є створення стоматологічної лакоформеної композиції, яка забезпечує стабільність антимікробного пептиду галоцину KPS1 у складі полімерної основи, тривале та контрольоване його вивільнення, а також ефективний вплив на *S. mutans* та інші карієсогенні бактерії у складі щільної біоплівки.

Для вирішення поставленої задачі було створено композицію, у якій галоцин KPS1 інкорпорований у полімерну маловодну матрицю на основі шелаку, поліакрилатів або уретан-акрилатних смол. Така основа мінімізує деградацію пептиду, забезпечує формування еластичної плівки та запобігає швидкому вимиванню з поверхні зубів. Органічні розчинники, зокрема етанол або етилацетат, дозволяють отримати однорідний розчин та сприяють рівномірному розподілу активної речовини.

Оптимізація співвідношення полімерів і розчинників дозволила досягти тривалості вивільнення у межах 8–24 годин, що значно перевищує можливості водних спреїв, ополіскувачів або паст. Крім того, пептид, зафіксований у полімерній плівці, краще проникає в структуру біоплівки, оскільки контактує з нею протягом тривалого часу.

Завдяки стабілізації пептиду в маловодній полімерній матриці та оптимальному підбору технологічних параметрів було досягнуто суттєвого підвищення антимікробної активності та пролонгованого ефекту.

#### **10.4. Опис запропонованого способу**

Запропонований спосіб передбачає отримання стоматологічного антимікробного лаку шляхом інкорпорації галоцину KPS1 у полімерно-розчинникову систему з низькою часткою води. Спочатку галоцин KPS1 готують у вигляді концентрату, стабілізованого в умовах, що запобігають деградації пептиду. Після цього його додають до полімерної основи, яка містить один або декілька компонентів: шелак, поліакрилатну смолу, уретан-акрилатну смолу чи їх комбінації.

Органічні розчинники — етиловий спирт або етилацетат — використовують для розчинення полімерної матриці та рівномірного розподілу активного пептиду. Суміш ретельно перемішують до утворення прозорого однорідного розчину. Після досягнення необхідної консистенції розчин фільтрують та фасують у флакони або одноразові туби з аплікаторами.

Після нанесення на емаль упродовж 20–40 секунд розчин висихає, утворюючи прозору або слабо забарвлену плівку. Полімерна матриця фіксує галоцин на поверхні зуба, забезпечуючи контрольовану дифузію активної речовини. Галоцин вивільняється протягом 8–24 годин залежно від складу полімеру, що суттєво підвищує антимікробну ефективність проти *Streptococcus mutans*, здатного колонізувати емаль та формувати стійкі біоплівки.

Запропонований спосіб дозволяє уникнути втрати активності пептиду, характерної для водних стоматологічних форм. Завдяки маловодній композиції та плівкоутворювальним властивостям лаку забезпечується стабільність галоцину, висока адгезія до емалі, контрольована дифузія активної речовини та ефективний вплив на патогенні мікроорганізми протягом тривалого періоду.

#### **10.5. Формула корисної моделі**

Стоматологічний антимікробний лак, що містить полімерну основу, органічний розчинник та активну речовину, відрізняється тим, що як активну

речовину містить галоцин KPS1 у концентрації 0,01–1,0% мас., а як полімерну основу містить шелак, поліакрилатну або уретан-акрилатну смолу чи їх суміші, причому органічний розчинник вибраний із групи етанол та/або етилацетат, а композиція після нанесення на зуби формує прозору плівку з пролонгованим вивільненням активної речовини упродовж 8–24 годин, забезпечуючи стабільність пептиду та антимікробну активність проти *S. mutans*.

#### **10.6. Реферат**

Корисна модель належить до фармації та стоматології і описує стоматологічний антимікробний лак на основі галоцину KPS1, призначений для профілактики карієсу та зниження біоплівкоутворення *S. mutans*. Лак містить маловодну полімерну основу (шелак, поліакрилати або уретан-акрилатні смоли) та органічний розчинник (етанол або етилацетат). Після нанесення композиція утворює стійку прозору плівку, яка забезпечує контрольоване вивільнення галоцину протягом 8–24 годин. Заявлена корисна модель забезпечує стабільність пептиду, тривалу локальну дію та підвищену антимікробну ефективність у порівнянні з відомими аналогами.

## ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі проведено комплексне дослідження щодо створення стоматологічного антимікробного лаку на основі галоцину KPS1 та обґрунтовано його застосування для профілактики карієсу, пов'язаного з надмірним розвитком *S. mutans*. На основі аналізу літературних джерел встановлено, що традиційні стоматологічні засоби, включно з фторвмісними лаками та антисептичними покриттями, мають обмежену тривалість дії та не забезпечують селективного впливу на карієсогенні бактерії у складі біоплівки.

Розроблена лакоформена композиція містить галоцин KPS1 — антимікробний пептид архейного походження, що проявляє спрямовану активність проти *S. mutans*. Вперше здійснено інкорпорацію даного пептиду в маловодну полімерну основу, що поєднує шелак, поліакрилатні або уретан-акрилатні смоли з органічними розчинниками. Така технологія забезпечує стабілізацію галоцину, захист його від протеолітичної деградації та збереження активності упродовж тривалого часу.

Створена композиція формує на поверхні емалі прозору плівку, яка забезпечує тривале та контрольоване вивільнення активної речовини — від 8 до 24 годин залежно від складу матриці. Це суттєво підвищує антимікробну ефективність у порівнянні з традиційними водними формами та підсилює можливість проникнення пептиду в структуру мікробної біоплівки.

Проведений аналіз технологічних параметрів підтверджує промислову придатність способу отримання лаку, а також можливість його стандартного фасування й застосування у стоматологічній практиці. Запропонована корисна модель усуває ключові недоліки існуючих засобів, забезпечує високу селективність дії, пролонгований ефект та стабільність активної речовини.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Ackermann H.-W. 5500 Phages Examined in the Electron Microscope. *Arch. Virol.* 2007;152:227–243. doi: 10.1007/s00705-006-0849-1.

Amoozegar, M. A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H., & Ventosa, A. (2017). Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, 163(5), 623-645. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000463>

Årdal, C., Balasegaram, M., Laxminarayan, R., McAdams, D., Outterson, K., Rex, J. H., & Sumpradit, N. (2020). Antibiotic development—economic, regulatory and societal challenges. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 267-274. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0293-3>

Augusto, M. G., Scaramucci, T., Campos, T. M. B., Aoki, I. V., Schlueter, N., & Borges, A. B. (2022). Film-forming polymers for tooth erosion prevention. *Polymers*, 14(19), 4225. <https://doi.org/10.3390/polym14194225>

Bagińska, N., Harhala, M. A., Cieślik, M., Orwat, F., Weber-Dąbrowska, B., Dąbrowska, K., ... & Jończyk-Matysiak, E. (2023). Biological properties of 12 newly isolated *Acinetobacter baumannii*-specific bacteriophages. *Viruses*, 15(1), 231. <https://doi.org/10.3390/v15010231>

Baik, A., Alamoudi, N., El-Housseiny, A., & Altuwirqi, A. (2021). Fluoride varnishes for preventing occlusal dental caries: A review. *Dentistry journal*, 9(6), 64. <https://doi.org/10.3390/dj9060064>

Baik, A., Alamoudi, N., El-Housseiny, A., & Altuwirqi, A. (2021). Fluoride varnishes for preventing occlusal dental caries: A review. *Dentistry journal*, 9(6), 64. <http://dx.doi.org/10.3390/dj9060064>

Bax, R., & Green, S. (2015). Antibiotics: the changing regulatory and pharmaceutical industry paradigm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1281-1284. <https://doi.org/10.1093/jac/dku572>

Birrer, G. A., Murthy, S. S., Liu, J., & Estrada, J. (2001). Parenteral dosage forms. In *Separation Science and Technology* (Vol. 3, pp. 269-305). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(01\)80009-X](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(01)80009-X)

Cafilisch, K. M., Suh, G. A., & Patel, R. (2019). Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review. *Expert review of anti-infective therapy*, 17(12), 1011-1041. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1694905>

Campion, M., & Scully, G. (2018). Antibiotic use in the intensive care unit: optimization and de-escalation. *Journal of intensive care medicine*, 33(12), 647-655. <https://doi.org/10.1177/0885066618762747>

Cao, J., Ma, Q., Shi, J., Wang, X., Ye, D., Liang, J., & Zou, J. (2025). Cariogenic microbiota and emerging antibacterial materials to combat dental caries: A literature review. *Pathogens*, 14(2), 111. <https://doi.org/10.3390/pathogens14020111>

Cherukuri, G., Veeramachaneni, C., Rao, G. V., Pacha, V. B., & Balla, S. B. (2020). Insight into status of dental caries vaccination: A review. *Journal of Conservative Dentistry and Endodontics*, 23(6), 544-549. [https://doi.org/10.4103/JCD.JCD\\_402\\_20](https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_402_20)

Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.3390/md18010033>

Costa, T. D. L., Puppini-Rontani, R. M., & de Castilho, A. R. F. (2025). Preventing Oral Dual Biofilm Development with Innovative Bioactive Varnishes. *Journal of Functional Biomaterials*, 16(2), 70. <https://doi.org/10.3390/jfb16020070>

Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., ... & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., ... & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

Ding, D. J., & Lai, L. M. (2010). The biotechnological potential of the extreme halophilic archaea *Haloterrigena* sp. H13 in xenobiotic metabolism using a

comparative genomics approach.  
[https://doi.org/10.1080/09593331003734210?urlappend=%3Futm\\_source%3Dresearchgate.net%26utm\\_medium%3Darticle](https://doi.org/10.1080/09593331003734210?urlappend=%3Futm_source%3Dresearchgate.net%26utm_medium%3Darticle)

Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics*, 7(3), 66. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>

Dutta, B., & Bandopadhyay, R. (2022). Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00252-w>

Fang, Y., Chen, X., Chu, C. H., Yu, O. Y., He, J., & Li, M. (2024). Roles of *Streptococcus mutans* in human health: beyond dental caries. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1503657. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1503657>

Featherstone, J. D. (2000). The science and practice of caries prevention. *The Journal of the American dental association*, 131(7), 887-899. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>

Foláyan, M. O., Ishola, A. G., Abodunrin, O. R., Ndembi, N., & El Tantawi, M. (2025). Untreated early childhood caries is a potential disability: policy and programme implications for Africa. *Frontiers in Oral Health*, 6, 1546747. <https://doi.org/10.3389/froh.2025.1546747>

Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>

Galiana, C. P., Miralles-Robledillo, J. M., Bernabeu, E., Harfi, N., & Martínez-Espinosa, R. M. (2022). Genetic and protein engineering of halophilic enzymes. In *Extremozymes and their industrial applications* (pp. 249-278). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90274-8.00003-4>

Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., & Haldar, J. (2019). Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends in microbiology*, 27(4), 323-338. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>

Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 129-136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>

Green, S. I., Clark, J. R., Santos, H. H., Weesner, K. E., Salazar, K. C., Aslam, S., ... & Maresso, A. (2023). A retrospective, observational study of 12 cases of expanded-access customized phage therapy: production, characteristics, and clinical outcomes. *Clinical infectious diseases*, 77(8), 1079-1091. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad335>

Ha, J., Park, J. Y., Choi, Y., Chang, P. S., & Park, K. M. (2021). Comparative analysis of universal protein extraction methodologies for screening of lipase activity from agricultural products. *Catalysts*, 11(7), 816. <https://doi.org/10.3390/catal11070816>

Haque, R. U., Paradisi, F., & Allers, T. (2020). Haloferax volcanii for biotechnology applications: challenges, current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(4), 1371-1382. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10314-2>

Hatfull, G. F. (2018). Mycobacteriophages. *Microbiology spectrum*, 6(5), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0026-2018>

Heng, C. C. (2016). Tooth decay is the most prevalent disease. *Federal Practitioner*, 33(10), 31. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6373711/>

Jia, S., Wang, Y., Tian, P., Zhou, S., Cai, H., Gao, H., & Zang, J. (2017). A simple synthetic route of N-doped mesoporous carbon derived from casein extracted with cobalt ions for high rate performance supercapacitors. *Electrochimica Acta*, 250, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.07.131>

Johnsen, L., Fimland, G., Eijsink, V., & Nissen-Meyer, J. (2000). Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4798-4802. <https://doi.org/10.1128/aem.66.11.4798-4802.2000>

Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., ... & Górski, A. (2019). Factors determining phage

stability/activity: Challenges in practical phage application. *Expert review of anti-infective therapy*, 17(8), 583-606. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1646126>

Kamalesh, R., Karishma, S., Saravanan, A., & Yaashikaa, P. R. (2024). Emerging breakthroughs in membrane filtration techniques and their application in agricultural wastewater treatment: Reusability aspects. *Sustainable Chemistry for the Environment*, 8, 100183. <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2024.100183>

Kaur, R., & Tiwari, S. K. (2021). Purification and characterization of a new Halocin HA4 from *Haloferax larsenii* HA4 isolated from a salt lake. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1458-1466. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09823-2>

Kavitha, P., Lipton, A. P., Sarika, A. R., & Aishwarya, M. S. (2011). Growth characteristics and halocin production by a new isolate, *Haloferax volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India). *Res J Biol Sci*, 6, 257-262.

Kavitha, P., Lipton, A. P., Sarika, A. R., & Aishwarya, M. S. (2011). Growth characteristics and halocin production by a new isolate, *Haloferax volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India). *Res J Biol Sci*, 6, 257-262.

Khan, M., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS one*, 10(3), e0118557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>

Kiadehi, M. S. H., Amoozegar, M. A., Asad, S., & Siroosi, M. (2018). Exploring the potential of halophilic archaea for the decolorization of azo dyes. *Water Science and Technology*, 77(6), 1602-1611. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.040>

Kulis, E., Cvitkovic, I., Pavlovic, N., Kumric, M., Rusic, D., & Bozic, J. (2025). A Comprehensive Review of Antibiotic Resistance in the Oral Microbiota: Mechanisms, Drivers, and Emerging Therapeutic Strategies. *Antibiotics*, 14(8), 828. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14080828>

Kumar, V., & Tiwari, S. K. (2017). Halocin HA1: An archaeocin produced by the haloarchaeon *Haloferax larsenii* HA1. *Process Biochemistry*, 61, 202-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.010>

Kumar, V., Saxena, J., & Tiwari, S. K. (2016). Description of a halocin-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. *Archives of microbiology*, 198(2), 181-192. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1175-3>

Kumar, V., Singh, B., van Belkum, M. J., Diep, D. B., Chikindas, M. L., Ermakov, A. M., & Tiwari, S. K. (2021). Halocins, natural antimicrobials of Archaea: Exotic or special or both?. *Biotechnology advances*, 53, 107834. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107834>

Kumar, V., Singh, B., van Belkum, M. J., Diep, D. B., Chikindas, M. L., Ermakov, A. M., & Tiwari, S. K. (2021). Halocins, natural antimicrobials of Archaea: Exotic or special or both?. *Biotechnology advances*, 53, 107834. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107834>

Lach, J., Krupińska, M., Mikołajczyk, A., Strapagiel, D., Stączek, P., & Matera-Witkiewicz, A. (2023). Novel antimicrobial peptides from saline environments active against *E. faecalis* and *S. aureus*: identification, characterisation and potential usage. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11787. <https://doi.org/10.3390/ijms241411787>

Lach, J., Krupińska, M., Mikołajczyk, A., Strapagiel, D., Stączek, P., & Matera-Witkiewicz, A. (2023). Novel antimicrobial peptides from saline environments active against *E. faecalis* and *S. aureus*: identification, characterisation and potential usage. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11787. <https://doi.org/10.3390/ijms241411787>

Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., ... & Brady, L. J. (2019). The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology spectrum*, 7(1), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>

Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 8(3), 162. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>

Litchfield, C. D. (2011). Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(10), 1635. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1021-9>

Lucana, M. C., Arruga, Y., Petrachi, E., Roig, A., Lucchi, R., & Oller-Salvia, B. (2021). Protease-resistant peptides for targeting and intracellular delivery of therapeutics. *Pharmaceutics*, 13(12), 2065. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122065>

Mainka, T., Weirathmüller, D., Herwig, C., & Pflügl, S. (2021). Potential applications of halophilic microorganisms for biological treatment of industrial process brines contaminated with aromatics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(1-2), kuab015. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab015>

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

Martínez-Espinosa, R. M. (2024). Halocins and C50 carotenoids from haloarchaea: potential natural tools against cancer. *Marine Drugs*, 22(10), 448. <https://doi.org/10.3390/md22100448>

Meknaci, R., Lopes, P., Servy, C., Le Caer, J. P., Andrieu, J. P., Hacène, H., & Ouazzani, J. (2014). Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. *Extremophiles*, 18(6), 1049-1055. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0682-5>

Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., ... & Müller, R. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, 5(10), 726-749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>

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

Na, H. J., & Choi, M. S. (2024). Prevention of Enamel Decalcification Using

Fluoride Varnish. *Korean Academy of Preventive Dentistry*, 20(4), 151-155.  
<https://doi.org/10.15236/ijcpd.2024.20.4.151>

Najjari, A., Mejri, H., Jabbari, M., Sghaier, H., Cherif, A., & Ouzari, H. I. (2020). Halocins, bacteriocin-like antimicrobials produced by the archaeal domain: occurrence and phylogenetic diversity in halobacteriales. In *Extremophilic Microbes and Metabolites-Diversity, Bioprospecting and Biotechnological Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94765>

Najjari, A., Mejri, H., Jabbari, M., Sghaier, H., Cherif, A., & Ouzari, H. I. (2020). Halocins, bacteriocin-like antimicrobials produced by the archaeal domain: occurrence and phylogenetic diversity in halobacteriales. In *Extremophilic Microbes and Metabolites-Diversity, Bioprospecting and Biotechnological Applications*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.94765>

Naor, A., Yair, Y., & Gophna, U. (2013). A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. *Extremophiles*, 17(6), 973-979. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0579-8>

O'connor, E., & Shand, R. F. (2002). Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 23-31. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000190>

Park, H. H., & Lee, I. B. (2011). Effect of glycerin on the surface hardness of composites after curing. *Restorative Dentistry and Endodontics*, 36(6), 483-489. <https://doi.org/10.5395/JKACD.2011.36.6.483>

Pires, D. P., Costa, A. R., Pinto, G., Meneses, L., & Azeredo, J. (2020). Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS microbiology reviews*, 44(6), 684-700. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa017>

Pirzadah, T. B., Malik, B., & Hakeem, K. R. (Eds.). (2021). Plant-microbe dynamics: recent advances for sustainable agriculture. [https://doi.org/10.1201/9781003106784?urlappend=%3Futm\\_source%3Dresearchgate.net%26utm\\_medium%3Darticle](https://doi.org/10.1201/9781003106784?urlappend=%3Futm_source%3Dresearchgate.net%26utm_medium%3Darticle)

Platas, G., Meseguer, I., & Amils, R. (2002). Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. *International Microbiology*, 5(1), 15-19. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0053-4>

Price, L. B., & Shand, R. F. (2000). Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *Journal of bacteriology*, 182(17), 4951-4958. <https://doi.org/10.1128/jb.182.17.4951-4958.2000>

Qussi, B., & Suess, W. G. (2006). The influence of different plasticizers and polymers on the mechanical and thermal properties, porosity and drug permeability of free shellac films. *Drug development and industrial pharmacy*, 32(4), 403-412. <https://doi.org/10.1080/03639040600559099>

Renwick, M., & Mossialos, E. (2018). What are the economic barriers of antibiotic R&D and how can we overcome them?. *Expert opinion on drug discovery*, 13(10), 889-892. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1515908>

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

Ri, C. H., Li, S. R., Paek, C. I., & Kim, Y. S. (2023). Functional expression of an antimicrobial peptide, belonging to halocin C8 family, from *Natrinema* sp. RNS21 in *Escherichia coli*. *Extremophiles*, 27(3), 21. <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01308-0>

Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vílchez, C., Bonete, M. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13(9), 5508-5532. <https://doi.org/10.3390/md13095508>

Rotaru, M., Singeap, A. M., Ciobica, A., Huiban, L., Stanciu, C., Romila, L., ... & Trifan, A. (2024). Oral health and “modern” digestive diseases: pathophysiologic and etiologic factors. *Biomedicines*, 12(8), 1854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12081854>

Rouwenhorst, R. J., Jzn, J. F., Scheffers, W. A., & van Dijken, J. P. (1991). Determination of protein concentration by total organic carbon analysis. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 22(2), 119-128. <https://doi.org/10.1016/0165->

Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. *Water*, *12*(12), 3313. <https://doi.org/10.3390/w12123313>

Shand, R. F., & Leyva, K. J. (2007). Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobocins. In *Bacteriocins: ecology and evolution* (pp. 93-109). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_5)

Singh, A., & Singh, A. K. (2017). Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. *Biotechnology letters*, *39*(12), 1793-1800. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2434-y>

Streicher, L. M. (2021). Exploring the future of infectious disease treatment in a post-antibiotic era: A comparative review of alternative therapeutics. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *24*, 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.025>

Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2017). Staphylococcus aureus infection. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

Thompson, D. W., Casjens, S. R., Sharma, R., & Grose, J. H. (2019). Genomic comparison of 60 completely sequenced bacteriophages that infect *Erwinia* and/or *Pantoea* bacteria. *Virology*, *535*, 59-73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.06.005>

Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (2004). Protein and amino acids for athletes. *Food, Nutrition and Sports Performance II*, 104-129. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234922/>

Tomé, D. (2021). Yeast extracts: Nutritional and flavoring food ingredients. *ACS Food Science & Technology*, *1*(4), 487-494. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00131>

Torres-Barceló, C. (2018). Phage therapy faces evolutionary challenges. *Viruses*, *10*(6), 323. <https://doi.org/10.3390/v10060323>

Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, *40*(4), 277.

Venturini, C., Petrovic Fabijan, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S., & Iredell, J. (2022). Biological foundations of successful bacteriophage therapy. *EMBO Molecular Medicine*, 14(7), e12435. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012435>

Voica, D. M., Bartha, L., Banciu, H. L., & Oren, A. (2016). Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 363(14), fnw146. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw146>

Yin, I. X., Udduttulla, A., Xu, V. W., Chen, K. J., Zhang, M. Y., & Chu, C. H. (2025). Use of Antimicrobial Nanoparticles for the Management of Dental Diseases. *Nanomaterials*, 15(3), 209. <https://doi.org/10.3390/nano15030209>

Zaman, M. S., Alam, S. G., & Razzaque, M. S. (2025). Oral Hygiene and Cardiovascular Health. *Hygiene*, 5(2), 14. <https://doi.org/10.3390/hygiene5020014>

Zhang, O. L., Niu, J. Y., Yin, I. X., Yu, O. Y., Mei, M. L., & Chu, C. H. (2023). Bioactive materials for caries management: A literature review. *Dentistry journal*, 11(3), 59. <https://doi.org/10.3390/dj11030059>

Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 7. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2024. — Т. 1. — 296 с.

Карлаш, Ю. В. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Національний університет харчових технологій. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.