

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

прізвище)

(ім'я та

« ____ » червня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

прізвище)

(ім'я та

« ____ » червня 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова,
харчова, природоохоронна»

на тему: «Біосинтез такролімусу *Streptomyces tsukubaensis*»

Виконав: здобувач IV курсу, групи II

ФЕДОРЧУК Аліна Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник

УДИМОВИЧ Віктор Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) незарядженої 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 бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології

і _____

мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Федорчук Аліни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез такролімусу *Streptomyces tsukubaensis*»

керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, доктор філософії, ст. викл.

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 31 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Streptomyces tsukubaensis*; цільовий продукт: такролімус; геометричний об'єм ферментера: 630 л; коефіцієнт заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема одержання такролімусу *Streptomyces tsukubaensis* - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема одержання такролімусу *Streptomyces tsukubaensis* - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада	Підпис, дата
--------	------------------------------	--------------

	консультанта	завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.25-	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента		
3	Техніко-економічне обґрунтування		
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
5	Специфікація обладнання		
6	Опис технологічної схеми		
7	Контроль виробництва		
8	Оформлення кваліфікаційної роботи		
9	Оформлення графічної частини	31.05.25	

Здобувач

(підпис)

Аліна ФЕДОРЧУК

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Віктор УДИМОВИЧ

(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	2
1.1 Загальна характеристика.....	2
1.2 Хімічні властивості та механізм дії.....	13
1.3 Сфери застосування.	14
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика <i>Streptomyces tsukubaensis</i>	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	21
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	24
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	26
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	27
3.1 Розрахунок потреби у цільовому продукті.	27
3.2 Розрахунок потужності виробництва такролімусу.	29
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.	30
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.	30
РОЗДІЛ 4. Біосинтез такролімусу	33
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату <i>Streptomyces tsukubensis</i>	33
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у такролімус.....	34
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	39
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	39
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	41
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	43
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів	43
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів	49
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	54
5.4.1 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	54

5.4.2. Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину	56
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	57
5.4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	58
5.4.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу такролімусу	60
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	62
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	65
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	75
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	79
9.1. Мікробіологічний контроль	79
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	80
9.2.1. Концентрація біомаси	80
9.2.2. Концентрація цільового продукту	81
9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	82
ЛІТЕРАТУРА	90

ABSTRACT

This qualification work, devoted to the development of technological and instrumental schemes for the biosynthesis of tacrolimus using *Streptomyces tsukubaensis*, considered its applicability and calculated the need for treatment of autoimmune diseases, namely atopic dermatitis.

The annual demand for the product was calculated to be 22,705.2 g. Given that this microorganism produces 1.5 g/l of the target metabolite during a seven-day cycle, the required production capacity was determined to be 630 litres to cover the annual demand.

The proposed scheme provides for both air work (preparation of sterile aeration air, preparation and sterilisation of 6% NaOH and preparation of 6% HCl, preparation and sterilisation of nutrient media) and the technological process (three stages of growing the seed material (in flasks on rockers, in 7 and 60 litre inoculators) and biosynthesis in a 630 litre fermenter with a filling coefficient of 0.6. A map of critical parameters was also drawn up for all stages prior to the start of fermentation and during the main biotechnological process.

The total volume of qualification work is 100 pages long, contains 23 tables, 11 figures, and consists of an introduction, nine chapters, a list of references (65 titles), appendices, technological (A1 format, 1 sheet) and equipment (A1 format, 2 sheets) diagrams.

Keywords: tacrolimus, *Streptomyces tsukubaensis*, autoimmune diseases, atopic dermatitis, biosynthesis.

РЕФЕРАТ

У даній кваліфікаційній роботі, що присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу такролімусу за допомогою *Streptomyces tsukubaensis*, було розглянуто його можливість застосування та розрахунку потреби в лікуванні аутоімунних захворювань, а саме при atopічному дерматиті.

Було розраховано річну потребу в продукті, що складає 22705,2 г. З огляду на те, що зазначений мікроорганізм продукує 1,5 г/л цільового метаболіту протягом семидобового циклу, визначено необхідний об'єм виробничої ємності — 630 літрів для покриття річної норми.

Запропонована схема передбачає проведення як допоміжних робіт (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізація 6% NaOH та приготування 6% HCl, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 7 та 60 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 630 л із коефіцієнтом заповнення 0,6. Також було складено карту контролю критичних параметрів на всіх етапах до запуску ферментації та під час основного біотехнологічного процесу.

Кваліфікаційна робота викладена на 100 сторінках, містить 23 таблиць, 11 рисунків, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (65 найменувань), додатків, технологічної (формат A1, 1 аркуш) та апаратурної (формат A1, 2 аркуші) схем.

Ключові слова: такролімус, *Streptomyces tsukubaensis*, аутоімунні захворювання, atopічний дерматит, біосинтез.

ВСТУП

На теперішній час спостерігається зростаючий інтерес до лікарських засобів, що будь-яким чином впливають на імунну систему, в тому числі препаратів, що пригнічують її. Ці препарати відкривають широкі можливості для розробки новітніх методів терапії, які можуть бути ефективними при різноманітних патологічних станах, зокрема тих, що пов'язані з порушенням імунної відповіді організму. Підвищення попиту на імуносупресивні засоби обумовлене необхідністю вдосконалення підходів до лікування захворювань, у яких надмірна або хибно спрямована активність імунної системи призводить до ушкодження власних тканин і органів. Розробка нових стратегій імуномодуляції дозволяє підвищити ефективність терапії, знизити ймовірність розвитку ускладнень та підвищити рівень життя хворих.

Одним із таких сучасних засобів є такролімус — препарат з вираженим імуносупресивним ефектом. Його дія полягає у пригніченні активації Т-лімфоцитів, що є ключовими клітинами у механізмах імунної відповіді. Завдяки здатності пригнічувати проліферацію цих клітин, такролімус ефективно знижує інтенсивність запального процесу та запобігає небажаним імунним реакціям.

Сфера застосування такролімусу є досить широкою. Препарат використовується не лише з метою запобігання реакції відторгнення після трансплантації органів, але й для лікування захворювань, пов'язаних із патологічною активністю імунної системи. Зокрема, він призначається пацієнтам із хронічними запальними процесами, де імунна система агресивно реагує на власні клітини, спричиняючи розвиток аутоімунних захворювань. Крім того, такролімус виявив свою ефективність при лікуванні запальних уражень шкіри, які супроводжуються вираженим свербінням, почервонінням та порушенням бар'єрної функції епідермісу, особливо у випадках, коли традиційна терапія є малоефективною або небажаною через можливі побічні ефекти[1].

Отже, новизна даної теми полягає у всебічному вивченні такролімусу з позицій як фармакології, так і біотехнології. Зокрема, одним із ключових аспектів є розробка

ефективних технологічних та апаратурних рішень для оптимізації процесу біосинтезу цього препарату із залученням мікроорганізму *Streptomyces tsukubaensis*, що є його природним продуцентом. Це відкриває можливості для більш економічного та екологічного способу отримання діючої речовини, що має високу терапевтичну цінність.

Крім того, інноваційність підходу полягає у розширенні уявлень про спектр дії такролімусу: акцент робиться не лише на його вже відомі імуносупресивні властивості, але й на потенційні альтернативні сфери застосування. Серед них — лікування запальних та аутоімунних захворювань шкіри, дослідження впливу препарату на різні ланки імунної відповіді, а також вивчення його дії при нових терапевтичних мішенях.

Дослідження такролімусу є вкрай актуальним у зв'язку зі зростанням кількості захворювань, пов'язаних із порушенням імунної відповіді, зокрема аутоімунних та алергічних патологій. Існуючі методи терапії, такі як застосування глюкокортикостероїдів, хоч і ефективні, мають низку обмежень через значні побічні ефекти при тривалому використанні. У цьому контексті такролімус виступає як перспективна альтернатива, здатна забезпечити м'який та вибірковий вплив на імунну систему без значного ризику ускладнень.

Крім того, важливим є вдосконалення біотехнологічних підходів до виробництва препарату, зокрема шляхом оптимізації умов біосинтезу за участю *Streptomyces tsukubaensis*. Це дозволяє не лише підвищити ефективність виробництва, а й зробити препарат більш доступним для широкого застосування.

Значна увага також приділяється розширенню терапевтичного потенціалу такролімусу, що може відкрити нові можливості його використання при інших імунозалежних захворюваннях. Усе це визначає наукову та практичну значущість подальшого вивчення препарату.

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

1.1 Загальна характеристика

Імуносупресивні препарати являють собою групу лікарських засобів, що належать до різних хімічних та фармакологічних класів і діють шляхом пригнічення або модуляції імунної відповіді організму. Їхня дія спрямована на зменшення активності імунної системи, що дозволяє контролювати патологічні імунні процеси, зокрема при аутоімунних порушеннях, а також знизити ризик імунного відторгнення у випадках трансплантації органів та тканин.[2].

Імуносупресія — це стан ослаблення імунної системи, коли її захисна здатність знижується порівняно з нормою. Це може бути як тимчасове явище, так і тривалий або постійний процес, зумовлений пригніченням ключових механізмів імунного захисту. З одного боку, імуносупресія може бути корисною — наприклад, для зменшення запалення при аутоімунних захворюваннях. Проте з іншого - вона підвищує сприйнятливості організму до інфекцій, роблячи його менш захищеним від зовнішніх загроз.

Основною причиною такого пригнічення є порушення роботи імунних клітин, зокрема Т-лімфоцитів, які відіграють важливу роль у захисті від хвороб. Імуносупресивні препарати часто навмисно впливають на ці клітини, щоб зменшити надмірну активність імунної системи, але при цьому послаблюється її здатність боротися з інфекціями [3].

Інтерес до цієї групи препаратів останніми роками значно зріс, що пов'язано не лише з поширенням хірургічних втручань із трансплантацією, але й з необхідністю ефективного лікування захворювань, при яких імунна система атакує власні тканини організму.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.З</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум. докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	<i>Літ..</i>	<i>Арк..</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Федорчук А.О</i>						10	98
<i>Перевір.</i>	<i>Удимович В.М.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр. Н.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В. П.</i>							

У клінічній практиці розроблені різні схеми імуносупресивної терапії, які застосовуються залежно від клінічної ситуації. Вони включають початкову терапію (індукцію), підтримуюче лікування для тривалого контролю імунної відповіді, а також інтенсивну терапію у випадках гострого відторгнення або загострення автоімунних процесів.

Серед препаратів, що застосовуються для підтримуючої терапії, особливе місце займають інгібітори кальциневрину — речовини, які блокують передачу сигналів усередині Т-клітин, тим самим зменшуючи їхню активність. До цього класу належать, зокрема, такролімус і циклоспорин, які широко застосовуються як у трансплантології, так і при лікуванні автоімунних захворювань.

Імуносупресивні засоби класифікуються на кілька основних груп залежно від механізму дії. До них належать стероїдні препарати, моноклональні антитіла, внутрішньовенний імуноглобулін та інгібітори сигнальних шляхів. Кожна з цих груп поділяється на підкласи із власними особливостями фармакокінетики та клінічного застосування. Такий підхід до класифікації дозволяє більш точно підібрати терапію відповідно до індивідуальних потреб пацієнта та конкретної клінічної ситуації.

Отже, розвиток імуносупресивної терапії залишається одним із ключових напрямів сучасної медицини, а її подальше вдосконалення сприяє розширенню підходів до боротьби із захворюваннями, пов'язаними з порушенням імунного балансу в організмі.[3,4].

Порівняльна таблиця такролімусу та циклоспорину А

Характеристика	Такролімус	Циклоспорин
Механізм дії	Зв'язується з FKBP (FK506-binding protein), пригнічує кальциневрин, блокує транскрипцію ІL-2 та інших цитокінів відповідно гальмує активацію Т-клітин[3,6]	Пригнічує синтез інтерлейкінів, необхідних для самоактивації та диференціювання Т-лімфоцитів[3,7]
Побічні ефекти	Підвищений ризик інфекцій і розвитку новоутворень, а також порушення з боку кровотворної системи, зокрема анемія, лейкопенія, тромбоцитопенія, геморагії, лейкоцитоз і розлади коагуляції. Можливі алергічні реакції, метаболічні порушення, такі як гіперглікемія, гіперкаліємія та розвиток цукрового діабету. З боку нервової системи можливі безсоння, тремор, головний біль, зорові розлади, фоточутливість і шум у вухах. Також можуть виникати серцево-судинні порушення, включаючи ішемію коронарних судин, тахікардію та підвищений артеріальний тиск. З боку дихальної системи відзначаються задишка, плевральний випіт, диспное, фарингіт і кашель. Часто спостерігаються порушення з боку шлунково-кишкового тракту — діарея, нудота або блювання, а також можливе погіршення функції нирок. [3,5]	Підвищений ризик вірусних інфекцій (у тому числі інфекцій дихальних шляхів і сечовивідної системи), а також цитомегаловірусну інфекцію. Існує ймовірність розвитку новоутворень, серед яких папіломи шкіри, базальноклітинна і плоскоклітинна карцинома, дерматоз Боуена, лімфопроліферативні захворювання. Часто спостерігаються порушення функції нирок, тремор, головний біль, м'язові спазми, міалгії, артеріальна гіпертензія, гірсутизм, пірексія, загальна слабкість і втомлюваність. З боку шлунково-кишкового тракту можуть виникати діарея, анорексія, нудота та блювання. Крім того, можливі метаболічні порушення, зокрема гіперліпідемія, гіперхолестеринемія та втрата апетиту. Частими дерматологічними проявами є себорейний кератоз [3,7].
Недоліки	Застосування пов'язане з іншими імуносупресивними препаратами. Індивідуальний підбір дози, регулярний моніторинг токсичності, вартість, залежність від метаболізму СYP3A4, строгий режим прийому [4,5,6]	Висока концентрація терапевтичної дози. Вища ймовірність втрати трансплантата та гострого відторгнення. Вузьке коло застосування. Виробництво препарату пов'язане зі значним утворенням хімічних відходів, оскільки базується на синтетичних процесах. Індивідуальний підбір дози, регулярний моніторинг у крові. Взаємодія з великою кількістю лікарських засобів. Строгий режим прийому. Застарілий. [3,5,7].

Переваги	<p>Ширший профіль застосування</p> <p>Вища ефективність при трансплантації органів</p> <p>Кращий контроль над Т-клітинною відповіддю</p> <p>Менша частота гострого відторгнення</p> <p>Можливість застосування місцево (мазі)</p> <p>Здатність зберігати функцію трансплантованого органа в довгостроковій перспективі</p> <p>Можливість застосовування зі статинами</p> <p>Має здатність повернути назад відторгнення алотрансплантата після лікування циклоспорином і має потенціал для реіннервації нервів.</p> <p>Необмежена тривалість лікування</p> <p>Біодоступність і стабільний фармакокінетичний профіль при пероральному застосуванні</p> <p>Доступність генеричних форм та модифікованих препаратів пролонгованої дії[3,5,6]</p>	<p>Пригнічує CD4 + CD25 + Trigs, які можуть перешкоджати імунній толерантності, помірний інгібітор. Значно менші діабетичні ефекти порівняно з такролімусом, передбачуваність терапії[3,5,7].</p>
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Отже, і такролімус, і циклоспорин, мають подібні механізми дії та побічні ефекти, однак загалом такролімус, хоча й може спричиняти менше побічних реакцій, ніж циклоспорин, через природу свого виробництва. При порівнянні недоліків обох препаратів помітно, що в контексті їх застосування, такролімус має значно більше переваг. Його ефективність, краща переносимість і більш сприятливий профіль дії роблять його більш привабливим варіантом у порівнянні з циклоспорином. Отже, серед інгібіторів кальциневрину такролімус можна вважати більш перспективним та ефективним імуносупресивним засобом.

1.2 Хімічні властивості та механізм дії.

Такролімус, також відомий як FK506, є макролідною сполукою, що належить до класу лактонів із великою кількістю атомів у циклі (23-членні макроліди). Його молекулярна маса складає 822 г/моль. За фізико-хімічними властивостями він є ліпофільною речовиною, яка характеризується низькою температурою плавлення — близько 113–115 °С, і дуже високою температурою кипіння — понад 870 °С при нормальному атмосферному тиску. Висока ліпофільність забезпечує його здатність швидко проникати через клітинні мембрани та широко розподілятися по тканинах організму. У печінці препарат піддається активному метаболізму за участю

ферментів системи цитохрому P450, головним чином CYP3A4, що може призводити до значних міжіндивідуальних коливань у його концентрації[8,4].

Основна фармакологічна дія такролімусу полягає у пригніченні надмірної імунної активності, особливо у відповідь на чужорідні антигени. Цей ефект досягається шляхом специфічного впливу на Т-лімфоцити, які є ключовими клітинами у розвитку імунної відповіді. Процес полягає у блокуванні розмноження Т-клітин через зменшення використання генів для синтезу молекул РНК та білків[9].

Такролімус зв'язується з внутрішньоклітинними FKBP-білками (FK-binding proteins), утворюючи комплекс, що інгібує активність ферменту кальциневрину. Кальциневрин — це кальцій- та кальмодулін-залежна фосфатаза, яка активує транскрипційні фактори, необхідні для синтезу інтерлейкіну-2 (IL-2). Блокування цього процесу призводить до припинення проліферації Т-клітин, що є центральним у механізмі імуносупресивної дії.

Крім гальмування синтезу IL-2, такролімус також впливає на інші компоненти імунної відповіді. Він знижує експресію низки ранніх генів активації Т-клітин, що беруть участь у виробленні інших інтерлейкінів (IL-3, IL-4, IL-5), інтерферону-гамма (IFN- γ), фактора некрозу пухлини-альфа (TNF- α), а також факторів, що стимулюють ріст і диференціацію імунних клітин, зокрема гранулоцитів і макрофагів.

Попри те, що такролімус насамперед діє на клітинну ланку імунітету, є також докази його впливу на гуморальну відповідь, зокрема на активність Т-клітин і продукцію антитіл. Завдяки цим властивостям такролімус використовується не лише у трансплантаційній медицині, а й у терапії різних патологій, що супроводжуються імунною дисфункцією[4,10].

1.3 Сфери застосування.

Такролімус є потужним імуносупресивним засобом, який застосовується в різних формах – зокрема у вигляді мазей для місцевого застосування, пероральних капсул і внутрішньовенних ін'єкцій. Безпосереднім призначенням такролімусу як імуносупресивного препарату є лікування відторгнення органів чи алергенній реакції організму на трансплантацію. Іншою його сферою застосування є допомога

при різних аутоімунних захворюваннях, в тому числі помірного та тяжкому дерматиті.

Окрім затверджених показань, такролімус активно досліджується у терапії ряду інших захворювань. Його потенціал виявлено при лікуванні хвороби Крона, міастенії, ревматоїдного артриту, а також окремих шкірних патологій, таких як гнійний гідраденіт, синдром “трансплантат проти хазяїна” та системний червоний вовчак у дітей. У дерматології такролімус демонструє ефективність при лікуванні гіпертрофічних рубців та інших хронічних запальних дерматозів, завдяки своїй здатності пригнічувати активацію Т-клітин на місцевому рівні[11,12].

Його застосування може знайти своє місце й в офтальмологічній практиці. Завдяки протизапальним властивостям такролімус може входити до складу очних крапель для профілактики імунних реакцій після пересадки рогівки, зокрема для зниження ризику відторгнення після трансплантації.

Крім цього, розглядається перспективність використання такролімусу як нейрорегенеративного агента. Попри відомі, нейротоксичні, побічні дії на нервову систему, дослідження засвідчують його здатність стимулювати відновлення пошкоджених нервів у тваринних моделях. За припущеннями дослідників, це може бути пов'язано з високою концентрацією кальциневрину в тканинах нервової системи, але точний механізм такого ефекту ще недостатньо вивчений.[13].

У ортопедії та ревматології такролімус розглядають як препарат, здатний зменшувати запалення й ушкодження тканин, спричинені аутоімунними процесами. Це пов'язано з тим, що під час аутоімунної реакції імунна система втрачає здатність розпізнавати власні клітини й сприймає їх як загрозу, що призводить до запального процесу. Завдяки здатності пригнічувати проліферацію Т-клітин, такролімус може ефективно зменшувати ураження суглобів, шкіри та інших органів.

Таким чином, такролімус є не лише високоефективним імуносупресором, але й має значний потенціал у лікуванні широкого спектра патологій, пов'язаних з імунною дисфункцією. Незважаючи на це, більшість його додаткових можливостей застосування потребують подальших фундаментальних і клінічних досліджень[14].

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика *Streptomyces tsukubaensis*

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Після початкового відкриття сполуки кілька таксономічно різноманітних штамів стрептоміцетів були зареєстровані як продуценти такролімусу, включаючи *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces tacrolimicus* та *Streptomyces clavuligerus* [15]. На жаль, дослідники не проводили визначення концентрації утвореного такролімусу у більшості штамів стрептоміцетів, що були зареєстровані як продуценти такролімусу, у зв'язку з чим неможливо використати дані штами для порівняння.

Stsukubaensis є одним з перших та найефективніших продуцентів такролімусу. Дослідження показали, що можна підвищити ефективність виробництва такролімусу за допомогою ультрафіолетового опромінення в умовах спеціально створеної плазми, яка існує при кімнатній температурі і атмосферному або трохи вищому тиску. Додатково, покращення виробництва досягається шляхом оптимізації умов, що включає випробування різних середовищ для культивування та визначення оптимальної концентрації та часу додавання Tween 80, за допомогою спеціальних методів, таких як план Планкетта-Бермана та центральний композитний аналіз. В результаті таких досліджень було отримано штам *S. tsukubaensis* FIM-16-06, який виробляє досить високий рівень такролімусу[16]. Також, одним з промислових продуцентів такролімусу є *S. tacrolimicus* та *S. clavuligerus*, який порівняно з *S. tsukubaensis* самостійно виробляє доволі низькі рівні даного імуносупресанту.[17, 18, 19].

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Федорчук А.О				РОЗДІЛ 2 Обґрунтування вибору та характеристика <i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.	Удимович В.М.						16	98
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.								
Затверд.	Стабніков В. П.							

В оптимізованому середовищі виробництво такролімусу досягло *S. tsukubaensis* 1293 мг/л при вирощуванні на колбах на качалці, і 1522 мг/л, коли масштабна ферментація проводилася в 1000-літровому ферментері. В той час коли *S. tacrolimicus* та *S. clavuligerus* показав виробництво такролімусу на рівні 82,5 мг/л та 200 мг/л відповідно[16, 17, 18, 19].

Зведені результати щодо здатності різних мікроорганізмів до синтезу такролімусу подано в табл. 2.1. Найвищу продуктивність демонструє штам *S. tsukubensis*, що утворює 1293 мг/л такролімусу. Для порівняння, *S. tacrolimicus* і *S. clavuligerus* продукують лише 82,5 мг/л та 200 мг/л відповідно. Водночас умови культивування, зокрема тривалість процесу та склад поживного середовища, значно відрізняються між штамми. З огляду на це, наступним кроком є оцінка вартості поживних середовищ для кожного з досліджуваних мікроорганізмів (табл. 2.2).

Як показано в табл. 2.2, середовище для вирощування *S. tsukubensis* є економічно вигіднішим порівняно з середовищами для *S. tacrolimicus* та *S. clavuligerus*. Водночас тривалість культивування *S. tsukubensis* є коротшою за *S. tacrolimicus*, але перевищує тривалість вирощування *S. clavuligerus*.

Для остаточного визначення найоптимальнішого біологічного продуцента доцільно розрахувати умовну вартість 1 мг цільової речовини (табл. 2.3). Згідно з табл. 2.3, найменша умовна вартість виробництва такролімусу (5,17 грн/мг) спостерігається у випадку використання *S. tsukubensis*, який, до того ж, має найвищу швидкість синтезу – 9,06 мг/год.

Отже, *Streptomyces tsukubaensis* є найкращим варіантом серед них для продукування такролімусу через його високу продуктивність. Крім того, він вже був оптимізований для виробництва такролімусу, що робить його більш практичним для використання в промисловості.

Порівняльна характеристика продуцентів такролімусу

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, мг/л	Умови культивування	Література
<i>Streptomyces tsukubensis</i> FIM-16-06	40 кукурудзяного крохмалю 20 пептону 20 глюкози 20 соєвого шроту 0,025 CuSO ₄ 0,25 MgSO ₄ 1 NaCl 3 CaCO ₃	1522	pH 7,5 28 С Перемішування 250 об/хв 168 годин.	Yan, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Yang, H., Qiu, G., Wang, D., & Lian, Y. (2021). Improvement of tacrolimus production in <i>Streptomyces tsukubaensis</i> by mutagenesis and optimization of fermentation medium using Plackett–Burman design combined with response surface methodology. <i>Biotechnology Letters</i> , 43(9), 1765-1777
<i>Streptomyces tacrolimicus</i> ATCC 55098	35 лактози 10 глюкози 11,25 пептону 0,477 FeSO ₄ 0,257 MgSO ₄ 1 NaCl 0,8 CaCl ₂ 0,5 KNO ₃ 10 дріжджового екстракту	82,5	pH 7,5 28 °С перемішування 220 об/хв 120 год	Singh, B. P., Kumar, P., Haque, S., Jawed, A., & Dubey, K. K. (2017). Improving production of tacrolimus in <i>Streptomyces tacrolimicus</i> (ATCC 55098) through development of novel mutant by dual mutagenesis. <i>Brazilian Archives of Biology and Technology</i> , 60.
<i>Streptomyces clavuligerus</i> CKD 1119	50 розчинного крохмалю 5 кукурудзяного порошку 30 бававняного борошна 30 кукурудзяної олії 2 малонової кислоти 0,5 метіоніну 0,3%(об/об) етанолу 0,1 FeSO ₄ ·7H ₂ O 1 CaCO ₃ 0,2 NaH ₂ PO ₄	200	pH 8 25 °С перемішування 220 об/хв 192 год	Kim, H. S., & Park, Y. I. (2007). Lipase activity and tacrolimus production in <i>Streptomyces clavuligerus</i> CKD 1119 mutant strains. <i>Journal of microbiology and biotechnology</i> , 17(10), 1638-1644.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів такролімусу

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонент а (грн) на 1 л середовищ а	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>Streptomyces tsukubensis</i> FIM-16-06	40 кукурудзяного крохмалю	360	14,4	2
	20 пептону	1530	30,6	2
	20 глюкози	42	0,84	2
	20 соєвого шроту	28	0,56	1
	0,025 CuSO ₄	150	0,00375	1
	0,25 MgSO ₄	17	0,00425	3
	1 NaCl	80	0,08	5
	3 CaCO ₃	60	0,06	6
Вартість 1 л середовищ 46,842 грн				
<i>Streptomyces tacrolimicus</i> ATCC 55098	35 лактози	71	2,485	2
	10 глюкози	42	0,042	2
	11,25 пептону	1530	17,2125	2
	0,477 FeSO ₄	45	0,021465	1
	0,257 MgSO ₄	17	0,004369	3
	1 NaCl	80	0,08	5
	0,8 CaCl ₂	60	0,048	1
	0,5 KNO ₃	64,8	0,03215	6
	10 дріжджовий екстракт	4508,3	45,083	6
Вартість 1 л середовищ 65,0085 грн				

Закінчення табл.2.2

<i>Streptomyces clavuligerus</i> CKD 1119	50 розчинного крохмаль	360	18	2
	5 кукурудзяного борошна	24	0,12	1
	30 вапнякове борошна	7	0,21	1
	30 кукурудзяної олії	280	8,4	1
	2 малонової кислоти	17 441	34,882	6
	0,5 метіоніну	5786	2,893	6
	0,3%(об/об) етанолу	2172	0,65	6
	0,1 FeSO _x 7H ₂ O	722	0,0722	6
	1 CaCO ₃	60	0,06	6
	0,2 NaH ₂ PO ₄	210	0,042	6
Вартість 1 л середовищ: 65,33				

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2024 р. -1 <http://prom.ua>, 2 - <https://www.systopt.com.ua>; 3 -<https://tovpaz.com/> 4 - <https://4sezon.com.ua/ua> 5 - <https://silur.prom.ua/> 6 <https://shop.hlr.ua/ua>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г поверхнево-активних речовин, синтезованих на суміші ростових субстратів такролімусу

Продуценти	Концентрація продукту, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного такролімусу за годину, мг/год	Вартість 1л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/мг
<i>Streptomyces tsukubensis</i> FIM-16-06	1522	168	9,06	46,842	0,031
<i>Streptomyces tacrolimicus</i> ATCC 55098	82,5	120	0,69	65,0085	0,79
<i>Streptomyces clavuligerus</i> CKD 1119	200	192	1,042	65,33	0,33

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Обчислення компонентного складу поживного середовища для культивування ауксотрофного штаму *S. tsukubaensis*, що синтезує імуносупресивну сполуку такролімус, проводиться з урахуванням даних параметрів: тривалість вирощування становить 168 годин, кінцева концентрація такролімусу в культуральній рідині — 1,293 г/л, а біомаси — 0,285 г/л.

Першим кроком є визначення кількості вуглецю в 100 г цільового продукту, що вираховується відповідно до молекулярної маси такролімусу ($C_{44}H_{69}NO_{12}$) дорівнює, яка 804 г/моль. Відповідно молекулярної формули у такролімусі міститься 528 г елементного карбону. Отже, у 0,285 г такролімусу буде $(528 \times 0,285) / 804 = 0,19$ г вуглецю.

Далі обчислюємо, яка маса кукурудзяного крохмалю відповідає цій кількості вуглецю. Відомо, що 162 г крохмалю містять 72 г карбону. Тоді для отримання 0,19 г вуглецю необхідно $(162 \times 0,19) / 72 = 0,43$ г крохмалю. З урахуванням того, що близько 40% вуглеводного джерела витрачається на енергетичні потреби (тобто окислюється до CO_2), остаточна концентрація крохмалю в середовищі повинна становити: $(0,43 \times 0,4) + 0,43 = 0,6$ г/л.

Аналогічні розрахунки проводяться для соєвого шроту. У 100 г цього компонента міститься приблизно 42 г карбону. Щоб забезпечити 0,19 г вуглецю, потрібно 0,45 г шроту. Враховуючи енергетичні втрати на окиснення, необхідна кількість становитиме: $(0,45 \times 0,4) + 0,45 = 0,63$ г/л.

Ще одним джерелом вуглецю у середовищі виступає глюкоза. Її молекулярна маса ($C_6H_{12}O_6$) становить 180 г/моль, з яких 72 г припадає на карбон. Таким чином, для отримання 0,19 г вуглецю необхідно $(180 \times 0,19) / 72 = 0,48$ г глюкози. Із врахуванням енергетичних витрат остаточна концентрація в середовищі складатиме $0,48 + (0,48 \times 0,4) = 0,67$ г/л.

Сумарно кількість вуглецю складає $0,6 + 0,63 + 0,67 = 1,9$ г

Потреби для синтезу біомаси. У складі біомаси приблизно 50% припадає на вуглець. Отже, у 0,285 г міститься $0,285 \times 0,5 = 0,14$ г вуглецю. Щоб забезпечити таку кількість вуглецю за рахунок цукрів, необхідно $(0,14 \times 162) / 72 = 0,315$ г

крохмалю. З урахуванням того, що близько 40% вуглеводів витрачається на енергетичні потреби клітини (тобто втрачається через окиснення), остаточна кількість крохмалю, потрібна для утворення 0,285 г/л біомаси, становить: $(0,315 \times 0,4) + 0,315 = 0,44$ г/л.

За аналогічним розрахунком, із поправкою на енергетичні втрати, кількість соєвого шроту та глюкози, необхідна для утворення такої ж маси біомаси, дорівнює 0,46 г і 0,49 г відповідно.

Отже, сумарна кількість джерел вуглецю, необхідна для утворення 0,285 г/л біомаси, складає 1,39 г.

У результаті, повний вміст джерел вуглецю в поживному середовищі, необхідний для синтезу як біомаси (0,285 г/л), так і такролімусу (1,293 г/л), становить 3,29 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припускаючи, що азот становить 10% від маси біомаси, у 0,285 г клітинної маси міститься 0,03 г нітрогену ($0,285 \times 0,10 = 0,03$ г).

Штам-продуцент такролімусу може засвоювати як мінеральні (зокрема амонійні), так і органічні форми азоту. Органічне джерело нітрогену представлено пептоном, який активно використовується у складі промислових поживних середовищ. До 80% пептону становлять білки, середній вміст азоту в яких наближено до 16%, що є характерним для більшості білкових сполук.

Щоб забезпечити 0,03 г нітрогену, необхідно визначити, яка маса білка потрібна. Відомо, що у 100 г білка міститься 16 г нітрогену. Отже, для забезпечення 0,03 г азоту необхідно $(100 \times 0,03) / 16 = 0,19$ г білка.

У перерахунку на пептон одержимо 0,24 г/л.

Потреби для синтезу такролімусу. Нітроген присутній не лише у складі біомаси, а й у структурі молекули такролімусу. Для розрахунку кількості пептону, необхідної для синтезу 100 г/л такролімусу, врахуємо його молекулярну масу — 804 г/моль. У кожних 804 г такролімусу міститься 14 г нітрогену, відповідно в 100 г речовини — $(100 \times 14) / 804 = 1,74$ г азоту.

Відомо, що пептон на 80% складається з білків, середній вміст нітрогену в яких становить близько 16%. Виходячи з цього, щоб забезпечити 1,74 г азоту, необхідно $(100 \times 1,74) / 16 = 10,9$ г білка. З урахуванням того, що білки становлять 80% маси пептону, потрібна маса пептону дорівнює $10,9 / 0,8 = 13,63$ г.

Для одержання 100 г/л такролімусу вміст пептону в середовищі повинен становити 13,63 г/л.

Розрахунок вмісту органічного азоту в пептоні. Оскільки, для одержання такролімусу використовується ауксотрофний мутантний штам *S. tsukabaensis*, який не має здатності синтезувати ряд амінокислот, тому вони відповідно повинні знаходитися у саму середовищі, що використовується для культивування. Зважаючи на середовище культивування, джерелами даних сполук будуть пептон та соєвий шрот. Для забезпечення продуценту необхідними для нього ростовими факторами концентрація соєвого шроту та пептону в середовищі становитиме близько 20 г/л.

Пептон є джерелом органічного Нітрогену. Зважаючи на те, що пептон має у своєму складі близько 14% амонійного азоту тому органічним азотом, що засвоюється *S. tsukabaensis* буде саме амонійний азот. Отже, у 20 г пептону міститься $(12 \times 20) / 100 = 2,4$ г Нітрогену.

Розрахуємо кількість амінного азоту, що міститься у 0,796 г пептону. Отже, вміст амінного азоту у пептоні становитиме $(4 \times 0,796) / 100 = 0,032$ г.

Відповідно загальний вміст Нітрогену у пептоні становитиме $2,4 + 0,032 = 2,43$ г/л. Отже, кількість Нітрогену, що необхідна для синтезу біомаси та такролімусу становитиме $3 + 1,74 = 4,74$ г/л.

Інші компоненти середовища

Зважаючи, що продуцент не продукує всі необхідні елементи, тому у відібраному середовищі, за їх синтез відповідатиме для Магнію, Кальцію та Феруму - $MgSO_4$ та пептон. Зважаючи на те, що *S. tsukabaensis* також є ауксотрофним штамом, йому необхідні певні ростові фактори, а саме – лейцин, ізолейцин, метіонін, треонін, тіамін та біотин, що наявні у складі соєвого шроту та пептону[20].

Результати розрахунків складу поживного середовища узагальнено у таблиці 2.4.

Склад поживного середовища для культивування *Streptomyces tsukubaensis*

Компоненти поживного середовища	Вміст г/л
Кукурудзяний крохмаль	0,44
Пептон	0,24
Глюкоза	0,46
Соевий шрот	0,63

Отже, за перевірочними розрахунками значення складу поживного середовища досить малі, тому при виробництві варто дотримуватися поживного середовища, що використовувався у дослідженні у зв'язку його з модифікацією та адаптацією під промислове виробництво.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Streptomyces tsukubensis – грампозитивний аеробний актиноміцет, який утворює розгалужений субстратний міцелій та рідкісні повітряні гіфи, які диференціюються в прямі або гнучкі ланцюжки коротких паличкоподібних спор з гладенькою поверхнею(рис 2.1, 2.2).[21] Форма спор циліндрична, діаметром 0,5–0,7 мкм, довжиною 0,7–0,8 мкм.[15]

На макроскопічному рівні спори мали інтенсивний сірий пігмент, а на певних середовищах *S. tsukubaensis* продукував пігмент від червоного до рожевого кольору(рис 2.3, 2.4)[21]

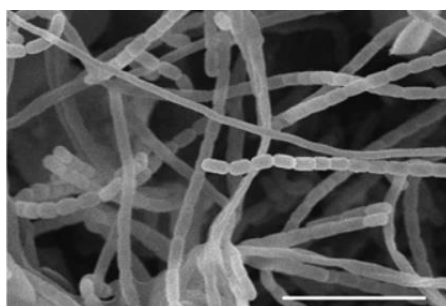


рис 2.1 Скануюча електронна мікрофотографія штаму 9993 T[15]

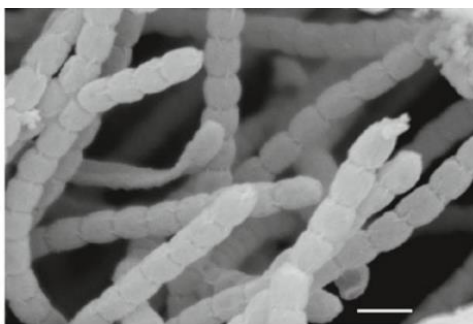


Рис. 2.2 Скануюча електронна мікрофотографія спор *S. tsukubaensis* NRRL 18488 на агарі з дріжджовим екстрактом/солодовим екстрактом [21]

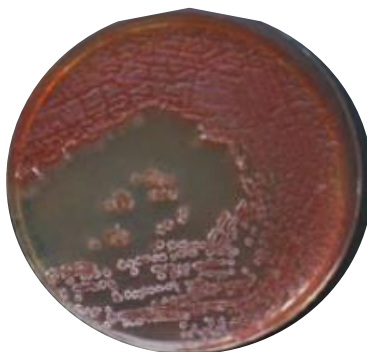


Рис. 2.3 Ріст *S. tsukubaensis* NRRL 18488 на агарі з дріжджовим екстрактом/солодовим екстрактом [21]



Рис. 2.4 Ріст *S. tsukubaensis* NRRL 18488 на агарі дріжджовим екстрактом/солодовим екстрактом [22]

Ріст *S. tsukubaensis* відбувається при 15–35 °С, оптимальною температурою росту спостерігався при 28 °С. [15]

Streptomyces tsukubaensis росте при переважно слаболужному рН (рН 6-8), оптимальним для продукування такролімусу є рН 7.5. Тому при культивуванні з ціллю отримання такролімусу є важливим суворе дотримання рН 7.5, адже зміна рН середовища (навіть у межах $\pm 0,5$) зменшує його продукцію[21].

Зростання *S. tsukubaensis* може відбуватися в присутності 4% NaCl. Після 1 тижня інкубації на даному середовищі відбувається ріст зелених колоній з безбарвним краєм, без повітряного міцелію. Крім того, колонії стають чорними на другий тиждень інкубації, утворюючи колонії, схожі на *Micromonospora*. При 7% NaCl ріст не спостерігався.

В гідролізатах клітинної стінки були виявлені LL-діамінопімелінова кислота, гліцин, глютамінова кислота та аланін, глюкоза була ідентифікована як цільноклітинний цукор[15]

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Хоча *Streptomyces tsukubaensis* був включений до роду *Streptomyces*, його таксономічне положення не було чітко визначено до 2013р.. Спочатку *S. tsukubaensis* був запатентований як *S. tsukubaensis* 9993 і пізніше внесений як *S. tsukubaensis* NRRL 18488. Використовуючи поліфазний підхід, було встановлено, що штам-продуцент такролімусу *S. tsukubaensis* NRRL 18488 представляє унікальний вид у роді *Streptomyces*, який філогенетично віддалений від інших описаних пізніше продуцентів такролімусу. [21]

Філогенетичну класифікацію для *Streptomyces tsukubaensis* наведено відповідно до Database BacDive[22]:

Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Actinomycetota</i>
Клас	<i>Actinomycetes</i>
Порядок	<i>Streptomycetales</i>
Родина	<i>Streptomycetaceae</i>
Рід	<i>Streptomyces</i>
Вид	<i>Streptomyces tsukubensis</i>

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1 Розрахунок потреби у цільовому продукті.

Такролімус – це імуносупресивний препарат, що має дію пригнічувати імунну реакцію організму, зокрема він гальмує проліферацію Т-клітин, які відіграють центральну роль у розпізнаванні та знищенні чужорідних антигенів.

Основними показаннями до застосування такролімусу є профілактика та лікування відторгнення органів та всіх пов'язаних хвороб з реакцією організму на чужорідні органи або анатомічні компоненти. Лікування станів, що виникають внаслідок помилкового сприйняття власних клітини чи тканини як чужорідних та намагається атакувати їх, тобто аутоімунних захворювань, в тому числі лікування помірних та тяжких проявів atopічного дерматиту[1].

Згідно за даними за 2023 рік, понад 2161 пацієнт потребує трансплантації органів[23]. Однак на відміну від даних, по пересадці органів, точної статистики, щодо поширеності аутоімунних захворювань та atopічного дерматиту в Україні відсутні у відкритому доступі. Відповідно візьмемо дані про кількість хворих на дані захворювання, у країнах Європи, в яких кількість пацієнтів хворих на аутоімунні захворювання складає до 10%[24] та з atopічним дерматитом складає близько 10% для дорослих та 20% дітей та підлітків віком до 16 років[25].

Варто зазначити, що при лікуванні різних аутоімунних захворювань, наприклад таких як ревматизм чи вовчак, такролімус використовується набагато рідше, але є доволі ефективним при лікуванні atopічного дерматиту, тому зважаючи на попередні данні, сфокусуємося на лікуванні саме на ньому.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.З</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум. докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	<i>Літ..</i>	<i>Арк..</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Федорчук А.О</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Удимович В.М.</i>					27	98
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр. Н.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В. П.</i>						

В Україні за підрахунками, що зробили у Фонді народонаселення ООН станом на 2023 рік проживало близько 36,7 мільйонів осіб. Серед них 15,2% громадян віком до 14 років, 64,6% – люди віком від 15 до 64 років та решту 20,2% становлять люди віком понад 65 років[26]. Це означає, що в Україні було приблизно 5,57 мільйонів дітей, 23,7 мільйонів дорослих та 7,41 мільйонів людей похилого віку.

При лікуванні atopічного дерматиту використовують таку лікарську форму препарату як мазь, яку наносять тонким шаром на уражені ділянки шкіри. Для дітей віком від 2 до 16 років застосовують мазь меншої концентрації 0,03%, яку наносять двічі на день протягом трьох тижнів. Дорослим та підліткам від 16 років, як правило, призначають мазь з концентрацією 0,1% потрібно наносити двічі на день до зникнення уражень, що зазвичай займає близько 3 тижнів. Для пацієнтів літнього віку окремі дослідження не проводилися[27].

Якщо припустити, що кількість хворих в Україні відповідає середньому значенню за європейськими дослідженнями в яких на atopічний дерматит хворіє близько 20% дітей та 10% дорослих, то це становить приблизно 1,11 мільйонів дітей та 2,37 мільйонів дорослих. Оскільки мазь наносять тонким шаром, допустимо, що вага складатиме близько 0,2 г для того, щоб можна було порахувати загальну кількість мазі, що необхідна для лікування. Для 2,37 млн хворих дорослих протягом 21 дня, становить 19 908 кг, а загальна кількість діючої речовини в цій кількості мазі складає 19 848 г. Відповідно для 1,11 млн хворих дітей кількість мазі становитиме 9324 кг та 2797,2 г діючої речовини.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в такролімусі

Група пацієнтів	Доза препарату при нанесенні на добу, г	Вміст такролімусу препарати, г	Тривалість прийому на 1 людину, доба	Кількість хворих в Україні на 2023 рік, млн осіб	Загальна кількість такролімусу на хворих, г
1	2	3	4	5	6
Дорослі та підлітки від 16 років	0,4	0,001	21	2,37	19 908
Діти від 2 до 16 років	0,4	0,0003	21	1,11	2 797,2
Всього:					22705,2 г

Примітка. Розрахунок враховує, що препарат Пропотик мазь випускається в тубах по 10, 30 та 60 г зі вмістом такролімусу 1 мг або 0,3 мг.

3.2 Розрахунок потужності виробництва такролімусу.

Згідно з даними Державного реєстру лікарських засобів [28], усі лікарські засоби на основі такролімусу, що реалізуються на українському ринку, мають іноземне походження. У період з 2009 р. по 2014 р. такролімус вироблявся українською ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я" під назвою Такрол–Здоров'я, однак після закінчення терміну державної реєстрації вони не поновили виробництво[29].

Відповідно до попередніх розрахунків, потреба в такролімусі становить 22705,2 г. Оскільки в Україні наразі відсутнє підприємство, що випускає даний препарат, пропонується виробництво такролімусу, що покриває 15% від загальної потреби у ньому. Відповідно, кількість виробленого такролімусу становитиме: $G_{\text{гп}} = 22705,2 \cdot 15\% = 3\,405,8$ г.

Обраний біологічний агент *Streptomyces tsukubensis* FIM–16–06 синтезує такролімус у концентрації 1522 мг/л[16]. Об'єм культуральної рідини, що потрібна для отримання 3 405,8 г такролімусу, становитиме:

$$\begin{aligned} 1.522 \text{ г} & - 1 \text{ л} \\ 3\,405,8 \text{ г} & - x \end{aligned} \quad X = 2237,7 \text{ л}$$

Якщо враховувати втрати при виділення, які становитимуть близько 20%, кількість культуральної рідини становитиме: $V_{\text{кр}} = 2237,7 \cdot 1,2 = 2685,2$ л

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

Відповідно до попередніх розрахунків, щоб мати змогу забезпечити річне виробництво такролімусу, що покриває потребу у такролімусі необхідно виробити 2685,2 л культуральної рідини, з урахуванням всіх втрат. Щоб визначити об'єм культуральної рідини, яку потрібно виробити за один цикл ферментації, необхідно обчислити кількість стадій для виготовлення посівного матеріалу. Приймаємо, що кількість трудоднів становить 3 літніх місяці, що відповідає 92 дням. Додаткова потреба в культуральній рідині тоді відповідно становить: $V_d = V_{гп} / T_{тр} = 2685,2/92 = 29,19$ л

Кількість одержаного такролімусу за один цикл становитиме:

$$V_{цк} = (K_1 * V_d * T_{цф}) / 24 = (1,5 * 29,19 * (168 + 8,5)) / 24 = 322 \text{ л/цикл,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, що включає виробничий біосинтез (168 год) та час підготовки ферментера до роботи (8,5 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних процедур ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Визначивши об'єм культуральної рідини за цикл та коефіцієнт заповнення K_3 , можна визначити геометричний об'єм ферментера: $V_{г} = V_{цк} / K_3 = 322 / 0,6 = 536,7$ л.

Як видно з таблиці, ферментер з об'ємом $V_{ф} = 630$ л є найбільш наближеним за геометричними параметрами. Далі уточнюється коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 322 / 630 = 0,51.$$

Даний коефіцієнт, хоча і є нижчим за прийнятий, однак він попадає в межі заповнення для аеробних процесів (0,5–0,65) [10].

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

У процесі виробництва такролімусу передбачено одержання 322 л культуральної рідини. Водночас слід зважати на втрати об'єму, які виникають унаслідок краплевиносу через систему відведення відпрацьованого повітря ($E_{ф}$); зазвичай вони становлять у межах 10–15%.

Отже, з урахуванням 10% втрат робочого об'єму поживного середовища та посівного матеріалу перед біосинтезом має становити: $V_{роб.1} = V_{кр} * (1 + E_{ф}) = 322 * 1,1 = 354,2$ л,

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

Таким чином, робочий об'єм ферментера дорівнює 354,2 л. З огляду на коефіцієнт заповнення 0,6, геометричний об'єм ферментера становитиме: $V_{\phi} = 354,2/0,6 = 590,3$ л. Найближчий стандартний ферментер - $V_{ст1} = 630$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з1} = 354,2/630 = 0,56$.

Кількість посівного матеріалу становитиме 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву $V_{роб.1} = 354,2$ л середовища необхідно приготувати $V_{пм1} = V_{роб.1} * X_{\phi} = 354,2 * 0,1 = 35,42$ л посівного матеріалу, де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера. Тоді об'єм поживного середовища в ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 354,2 - 35,42 = 318,8 \text{ л}$$

Зважаючи на втрати внаслідок краплевиносу, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} * (1 + E_{\phi}) = 35,42 * 1,1 = 39 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 39 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па2} = 39/0,6 = 65$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст2} = 60$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з2} = 39/60 = 0,65$. Коефіцієнт заповнення перебуває у межах для аеробних мікроорганізмів. Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Отже, для засіву $V_{роб.2} = 39$ необхідно приготувати

$$V_{пм2} = V_{роб.2} * X_{\phi} = 39 * 0,1 = 3,9 \text{ л посівного матеріалу,}$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити: $V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 39 - 3,9 = 35$ л

Врахуємо, що під час одержання 3,9 л посівного матеріалу в інокуляторі, втрати складатимуть 10 %, внаслідок краплевиносу, тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} * (1 + E_{\phi}) = 3,9 * 1,1 = 4,3 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 4,3 за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{па2} = 4,3/0,6 = 7,2$ л. Цей об'єм є стандартним, отже обираємо апарат $V_{ст3} = 7$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з,3} = 4,3/7 = 0,61$. Коефіцієнт попадає у межі для аеробних мікроорганізмів.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 4,3 л необхідно:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} * X_{ф} = 4,3 * 0,1 = 0,4 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

$$V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 4 - 0,4 = 3,6 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{пм3} = 0,4$ л (400 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням актиноміцетів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

$$\text{Тоді кількість колб становить: } N_{колб} = V_{пм3} / (V_{колб} * K_{зк}) = 400 / (750 * 0,2) = 3 \text{ колби}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу у такролімусу за допомогою *S. tsukubensis* необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 630 л, інокулятори об'ємом по 60 та 7 л та 3 качалочних колби.

Таблиця 3.2

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини, $V_{кр}$, л	Уточнений об'єм культуральної рідини*, $V_{роб}$, л	Об'єм посівного матеріалу $V_{пм}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера $V_{ст}$ л
1	2	3	4	5	6	7
IV	322**	354,2	35,42	318,8	0,6	630
III	35,42	39	3,9	35	0,6	60
II	3,9	4,3	0,4	3,6	0,6	7
I	0,4	0,4	–	0,4	0,2	3 колби

* З урахуванням $E_{ф}$

** Об'єм КР за один виробничий цикл, значення розраховано у п.3.3

РОЗДІЛ 4. Біосинтез такролімусу

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату *Streptomyces tsukubensis*

Streptomyces tsukubensis як основне джерело вуглецю використовує кукурудзяний крохмаль. Основуючись на інформації, яка представлена у KEGG для *S. tsukubensis*, катаболічним шляхом крохмалю є гліколіз. Схему катаболізму крохмалю у *Streptomyces tsukubensis* наведено згідно даних KEGG(рис 4.1).

Спершу крохмаль за участі глікогенфосфорилази (КФ. 2.4.1.1) перетворюється на альфа-глюкозо-1-фосфат. Далі глюкоза розкладається шляхом гліколізу.

Глюкоза під дією фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2) розкладається до глюкозо-6-фосфату з використанням АТФ, далі за допомогою глюкозо-6-фосфат-ізомерази (КФ.5.3.1.9) з використанням АТФ утворюється фруктозо-6-дифосфат. Після чого ферментативна дія 6-фосфотрикінази (КФ.2.7.1.11) зумовлює перетворення фруктозо-6-дифосфат на фруктозо-1,6-дифосфат з використанням АТФ. Далі дифосфотрикіназа (КФ.4.1.2.13) активує перетворення на гліцеральдегід-3-фосфат та анаплеротичну реакцію з утворенням діоксиацетинфосфат, який у свою чергу перетворюється під дією триозофосфатізомерази(КФ.5.3.1.1) у гліцеральдегід-3-фосфат, далі під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12) відбувається перетворення на 1,3- дифосфогліцерат з виділенням 2 молекул НАДН. Далі фермент фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3), перетворює 1,3- дифосфогліцерат в 3-фосфогліцерат, з виділенням 2 молекул АТФ, у свою чергу 3-фосфогліцерат утворює 2-фосфогліцерат за допомогою фосфогліцератмутази (КФ.5.4.2.11). Дія ферменту фосфопіруватгідратази (КФ.4.2.1.11) індукує перехід 2-фосфогліцерату у фосфоенолпіруват. На кінцевому етапі катаболізму відбувається перетворення фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ.2.7.1.40) у піруват з виділенням 2 молекул АТФ.

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ				
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Федорчук А.О			РОЗДІЛ 4. Біосинтез такролімусу		Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.		Удимович В.М.						33	98
Реценз.					Кафедра БТМ				
Н. Контр. Н.									
Затверд.		Стабніков В. П.							

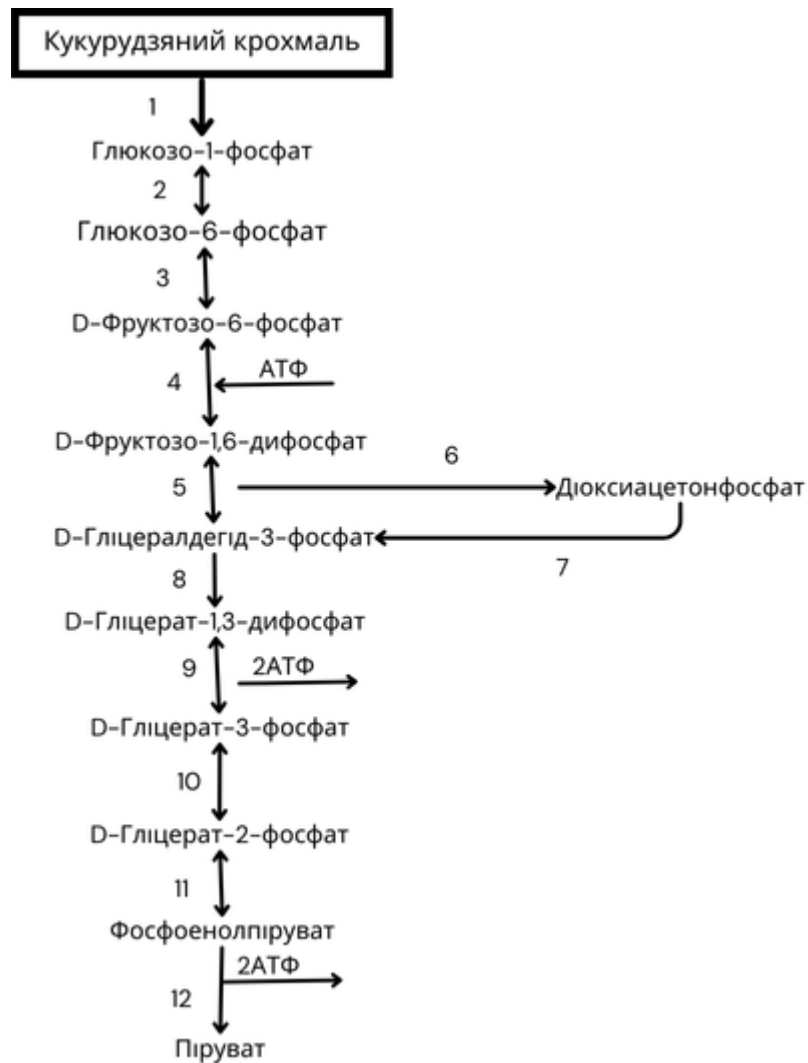


Рис 4.1. Шлях катаболізму крохмалю у *S.tsukubensis*

1- глікогенфосфорилази (КФ. 2.4.1.1), 2- фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2), 3-глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ5.3.1.9), 4- 6-фосфофруктокіназа (КФ2.7.1.11), 5- фруктозо-бісфосфатальдолаза, (КФ4.1.2.13), 6- фруктозо-бісфосфатальдолаза, (КФ 4.1.2.13) 7- триозофосфатізомераза (КФ5.3.1.1), 8- гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ1.2.1.12), 9- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 10- фосфогліцеромутаза (КФ 5.4.2.11), 11- фосфопіруватгідратаза(енолаза) (КФ 4.2.1.11), 12- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у такролімус

Біосинтез такролімусу в *S. tsukubaensis* здійснюється за допомогою системи гібридної полікетидсинтази (PKS) — нерибосомної пептидсинтетази.

Оскільки такролімус відноситься до білкових сполук, синтез його ферментів переважно заснований на трансляції генів, через що схему синтезу деяких ферментів у KEGG не наведено, тому для їх опису та схематичному зображенні використовувалися наукові дослідження.

Для синтезу такролімусу необхідними сполуками є 4,5-дигідроксициклогекс-1-енкарбонова кислота, Метилмалоніл-КоА, Малоніл-КоА, Аллімалоніл-КоА, Метоксималоніл-КоА та піпеколят, тому наведемо схему їх синтезу. Також так як цільовий продукт є білком при синтезі такролімусу заключаються всі 20 амінокислот.

Точного шляху синтезу аллімалоніл-КоА та Метоксималоніл-АСР не наведено у KEGG, тому їхня схема біосинтезу наведена згідно дослідження: Chen, D., Zhang, Q., Zhang, Q., Cen, P., Xu, Z., & Liu, W. (2012). Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Applied and environmental microbiology*.

При біосинтезі метоксималонілу-АСР, на 1,3-гліцерат-дифосфаті, FkbH приєднує гліцероїл до FkbJ, дискретного білку АСР, для отримання гліцероїл-АСР для послідовних складних модифікацій двома дегідрогеназами, FkbK і FkbI, і O-метилтрансферазою, FkbG, щоб забезпечити утворення метилмалонілу-АСР.

Шлях біосинтезу аллімалоніл-КоА опосередковується чотирма генами *tcs* (*tcsA*, *tcsB*, *tcsC* і *tcsD*). Кетоацилсинтаза *TcsB*, ацильована пропіонілом, каталізує конденсацію пропілового фрагмента з малонатом, за допомогою *TcsA*, який містить ацилтрансферазу та домен білка-носія ацилу (АСР). Отриманий β -кетопентил-АСР дає початок транс-2-пентеніл-АСР *TcsA* під дією системи ендогенної синтази жирних кислот (FAS). Послідовні модифікації АСР-зв'язаної пентенільної групи, включаючи відновне карбоксилювання за допомогою *TcsC*, а також дегідрування за допомогою FAD-залежного ферменту *TcsD*, утворюють аллімалоніл-КоА[31].

Синтез піпеколяту при біосинтезі такролімусу здійснюється шляхом циклодезамінування лізину за допомогою лізинциклодеамінази(КФ4.3.1.28) [33]

Синтез 4,5-дегідроксициклогекса-1-енкарбоксилової кислоти відбувається шляхом шикімате, де з фосфоенолпірувату під дією 3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтаза (КФ 2.5.1.54), утворюється 3-деокси-Д-арабіногептулозонат-7-фосфат, яка у свою чергу за допомогою ферменту.3-

дегідрокінатсинтаза (КФ 4.2.3.4) утворює 3-дегідрокінат, за допомогою 3-дегідрокінатдегідратаза II (КФ 4.2.1.10) утворюється 3-дегідрошикімат, який під дією позитивна шікімат 5-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.24) перетворюється у шікімат. Далі шікімат під дією 16- шікіматкіназа (КФ 2.7.1.71) утворюєшикімат-3-фосфат, який під дією 3-фосфошикімат-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19) перетворюється на 5-О-1-карбоксивініл-3-фосфошикімат. У ході хорісмаатсинтаза (КФ 4.2.3.5) утворюється хорісмаат, який під діє хорісмаатази (КФ 3.3.2.13) розкладається до 4,5-дигідроксициклогекса-1,5-дленекарбоксілова кислота, тоді під дією 5-енолпірувілшікімат-3-фосфатсинтазт він перетворюється на одну зі сполук для синтезу такролімусу - 4,5-дегідроксициклогекса-1-енекарбоксілова кислота.

Метил малоніл-КоА утворюється при перетворенні ізoleyцину шляхом перетворення самого ізoleyцину на 3-метил-2-оксопентаноат під дією аміно-4-дезоксихорісмаатліаза (КФ:2.6.1.42), далі сполука за допомогою 2-оксоізовалератдегідрогенази E1 субодиниця альфа (КФ1.2.4.4) утворює 2-метил-1-гідроксобутіл, який перетворюється на 2-метилбутанол-дигідроліпоамід-Е під дією Компонент 2-оксоізовалератдегідрогенази E2 (дигідроліпоїлтрансацилаза) (КФ2.3.1.168). Сполука під дією ацил-КоА дегідрогеназа (КФ1.3.8.5) утворює 2-метил-бутанол-КоА, який за допомогою еноіл-КоА гідратаза (КФ4.2.1.17) утворює транс-метил-бутанол-КоА та 3-гідрокси-бут-2-нол-Коа, які під дією 3-гідроксіацил-КоА дегідрогеназа (КФ1.1.1.35) розкладаються до 3-гідрокси-2-метилбутурол-Коа, який за допомогою ацетил-КоА ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.16), утворює Пропанол-КоА, що за допомогою пропіоніл-КоА-карбоксілазна субодиниця альфа (КФ6.4.1.3) дозволяю утворити метилмалоніл-КоА[33,34,35,36].

Ферменти: 1 - глікогенфосфорилаза (КФ 2.4.1.1), 2 - 1-фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2), 3 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9), 4 - 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11), 5 - фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13), 6 - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1), 7 - FkbH , 8 - FkbK, FkbG, FkbI, і O - метилтрансфераз, 9 - гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилуюча) (КФ 1.2.1.12), 10 - 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), 11 - фосфопіруватгідратази (КФ 4.2.1.11), 12 - 3-дезоксигліко-7-фосфогептулонатсинтаза (КФ 2.5.1.54), 13 - 3-дегідрохінатсинтаза (КФ 4.2.3.4), 14 - 3-дегідрохінатдегідратаза II (КФ 4.2.1.10), 15 - позитивна шикіат 5-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.24), 16 - шикіаткіназа (КФ 2.7.1.71), 17 - 3-фосфошикіат-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19), 18-хорісатсинтаза (КФ 4.2.3.5), 19 - хорісматаза (КФ 3.3.2.13), 20 - 5-енолпіруватшикіат-3-фосфатсинтаза, 21 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 22 - 2-оксокислота субодиниця бета-ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11), 23 - Ацетил-КоА Карбоксилаза (КФ 6.4.1.2), 24 - 3-гідроксипропіонатдегідрогеназа (НАДФ+) (КФ 1.1.1.298), 25 - Ацетилтрансфераза-АСР, 26 - ендогеннасинтетаза жирних кислот, 27 - TcsD , 28 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1), 29 - аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3), 30 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42), 31 - 2-оксоглутарат/2-оксокислота субодиниця бета-ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.3 1.2.7.11), 32 - бета-субодиниця сукциніл-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.5), 33 - залізо-сірчана субодиниця сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1), 34 - фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2), 35 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37), 36-метилмалоніл-КоА-мутала (КФ 5.4.99.2), 37-4-аміно-4-дезоксихоризматліаза (КФ:2.6.1.42), 38 - 2-оксоізовалератдегідрогенази E1 субодиниця альфа (КФ1.2.4.4) 39- Компонент 2-оксоізовалератдегідрогенази E2 (дигідроліпоїлтрансацилаза) (КФ2.3.1.168), 40 - ацил-КоА дегідрогеназа [(КФ1.3.8.5), 41 - еноіл-КоА гідратаза (КФ4.2.1.17), 42 - еноіл-КоА гідратаза, 43- 3-гідроксіацил-КоА дегідрогеназа (КФ1.1.1.35), 44 - ацетил-КоА ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.16), 45 - ацетил-/пропіоніл-КоА-карбоксилазна субодиниця альфа (КФ6.4.1.3), 46 - лізинциклодеамінази(КФ4.3.1.28).

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Такролімус виділяється з культуральної рідини *Streptomyces tsukubensis* – грампозитивного аеробного актиноміцету, який утворює розгалужений субстратний міцелій та рідкісні повітряні гіфи. В залежності від середовища, можливе продукування пігменту від червоного до рожевого кольору[21].

Продуцент такролімусу *Streptomyces tsukubensis* це аеробний мікроорганізм, для якого оптимальною температурою для вирощування є 28°C та рН 7,5. Беручи до уваги те, що значна частина мікроорганізмів розвивається в даних умовах, важливим є забезпечення стерильності умов при культивуванні такролімусу. З метою запобігання забруднення важливим є проведення стерилізації виробничого обладнання, комунікацій, титрувальних агентів та поживного середовища, що використовується при виробничому культивуванні. Зважаючи на те, що продуцент є аеробним мікроорганізмом, необхідно дотримуватися постійної аерації при культивуванні, що досягається використанням ерліфтного виробничого ферментера.

Унаслідок неможливості досягнення асептичних умов при використанні твердо-фазного культивування, культивування *S. tsukubensis* для біосинтезу такролімусу здійснюють глибинним способом. Зважаючи на це підготовка посівного матеріалу також здійснюється глибинним методом.

Виробництво такролімусу здійснюється періодичним методом, зважаючи на те, що найефективніша фаза синтезу такролімусу досягається під час стаціонарної фази росту мікроорганізмів. Даний підхід дозволяє продуценту максимально засвоїти поживне середовище, оскільки воно вноситься одноразово та споживається протягом усього періоду культивування.

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ..	Арк..	Аркушів
Розроб.		Федорчук А.О					39	98
Перевір.		Удимович В.М.						
Реценз.								
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В. П.				Кафедра БТМ		

Процеси стерилізації у даному випадку здійснюються послідовно в одному апараті за виключенням компонентів середовищ, яким потрібні інші умови стерилізації. Стерилізація самого апарату здійснюється перегрітою парою. Стерилізація повітря здійснюється кількома етапами різними фільтрами.

Отже, культивування продуцента такролімусу здійснюється за допомогою періодично глибинного методу в аеробних умовах та з забезпеченням стерильних умов[20, 37].

У випадку культивування такролімусу використовується ерліфтний ферментер, за допомогою чого створюється аерація та разом з тим перемішування за для покращення масообмінних процесів та кращого рівномірного розподілення культуральної рідини. Оскільки при культивуванні продуцента такролімусу передбачається встановлення ерліфтного ферментеру, тобто використання специфічного перемішуючого пристрою, який встановлений в самому ферментері. Для підтримання таких параметрів, як температура та рН, виробничий ферментер повинен мати сорочку та відповідні датчики. Зважаючи на передбачене утворення піни, необхідно використовувати хімічний піногасник, що буде додаватися відповідно до нарощення піни.

Як один з ферментерів для культивування з можна запропонувати ферментер від виробника Labist (Китай) [<https://www.lab1st.com/bioreactors>] або Fermentec (Південна Корея)[<http://fermentec.co.kr/eng/>] у яких є можливість замовити ферментери з необхідними параметрами.

Ферментера даних виробників передбачають автоматичну стерилізацію, та в них наявні наступні датчики: рівня піни, оптичної густини, рН та тиску. Зважаючи на специфікацію певних виробництв, виробниками передбачено встановлення певних датчиків на замовлення.

Відповідно до попереднього тексту, для проведення виробничого біосинтезу такролімусу за допомогою *Streptomyces tsukubensis* є необхідним замовити ерліфтний ферментер для забезпечення постійної аерації та приготування титрувальних розчинів з метою підтримання певного значення рН [37].

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Беручи до уваги те, що продуцентом такролімусу *Streptomyces tsukubensis* є облигатним аеробом, за для ефективного виробництва, необхідно забезпечити його розчиненим киснем за допомогою барботеру, що відповідно є однією з найважливіших стадій біосинтезу. Оскільки культивування здійснюється глибинним способом, відповідно потребуються стерильні умови, яка здійснюється за допомогою системи очищення та стерилізації[16].

Підготовка посівного матеріалу та розсів *S. tsukubensis* здійснюється в шафі біологічної безпеки (рис. 5.1) з постійним постачанням стерильного ламінарного повітря.



Рис.5.1 Ламінарна шафа біологічної безпеки HR1200–ПА2[38]

Основними методами очищення повітря на біотехнологічному підприємстві є фільтрація через шари насипного, пористого або волокнистого матеріалу.

Перед подачею в біореактор повітря проходить кілька стадій підготовки:

1. Забір атмосферного повітря. Відбувається за допомогою повітрозбірника на даху будівлі, на висоті 3 метри від верхньої межі даху або 10 метрів від землі.
2. Очищення повітря за допомогою фільтру грубої очистки. Проводиться з метою очищення від часток великого розміру та пилу. Являє собою попередню

очистку, зазвичай використовують металеву стружку, сітку або кільця Рашига змочені оливою чи набивки з грубих мінералів або синтетичних волокон. Перевага у виборі даних фільтрів надається фільтрам простої конструкції, які можна швидко регенерувати та ступінь очищення яких складає 50–80%.

3. Компресування та стабілізація термолабільних показників повітря. Стиснення відбувається при 0,35 МПа та температурі приблизно 180°C з метою забору більшого об'єму повітря, його первинного очищення та подальшого зручного фільтрування. Після чого відбувається охолодження за допомогою водяного теплообмінного апарату, до 20°C та видалення зайвої вологи.

4. Нагрівання повітря до 50°C у ресивері (рис.2) з метою видалення залишкової вологи та вирівнювання тиску.



Повітрязбірник, ресивер для стисненого повітря рис. 5.2.[39]

5. Очищення повітря на тонкому фільтрі. Відбувається очистка від дрібних часточок та мікроорганізмів. Як фільтри першого ступеня очистки використовуються зазвичай волокнисті матеріали, такі як скловолокно, базальтове волокно або різні нетканні матеріали з синтетичних волокон. Ступінь очистки становить близько 95–97%.

6. Очистка повітря на індивідуальному фільтрі. Остаточне очищення від мікроорганізмів з ступенем очистки 99,99%. Як індивідуальні фільтри можуть

використовуватися фільтри з волокнистих, зернистих або мембранних матеріалів. Найчастіше використовують фільтри з тканини Петрянова, тонку скловату, базальтове тонке та супертонке волокно. Використовують безпосередньо перед інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером.

Для очищення відпрацьованого повітря необхідно знову провести його через аналогічні головні фільтри та нагріти. В подальшому відпрацьовані фільтри знезаражують та відправляють на утилізацію[29,40].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Оскільки ми виробляємо лікарські препарати, вибір миючих і дезінфекційних засобів має вирішальне значення. Вони повинні ефективно усувати забруднення, знищувати мікроорганізми, не шкодити матеріалам та не залишати слідів, що можуть вплинути на якість продукції. Для запобігання стійкості мікроорганізмів рекомендовано змінювати засоби кожні 1–3 місяці.

Дезінфекція відіграє важливу роль у запобіганні поширенню мікроорганізмів, що можуть викликати різні захворювання. Регулярна та якісна обробка поверхонь допомагає знизити ризик зараження, особливо в місцях із високими вимогами до гігієни, таких як лікарні, лабораторії, виробничі приміщення та громадські заклади.

Для досягнення максимальної ефективності необхідно правильно підбирати дезінфекційні засоби. Вони мають відповідати встановленим санітарним нормам, бути безпечними у використанні та забезпечувати належний рівень мікробіологічного контролю. Важливо також дотримуватися рекомендацій щодо концентрації та часу обробки, щоб гарантувати знищення патогенних мікроорганізмів і підтримувати чистоту на необхідному рівні.

Миючі засоби застосовуються для видалення залишків сировини, допоміжних речовин, жирових і білкових забруднень з обладнання, робочих поверхонь та приміщень [41].

Дезінфекційний засіб «Дезосепт Форте» дозволений до використання на фармацевтичних, мікробіологічних та інших виробничих підприємствах. У нього

наявний широкий спектр антимікробної дії, що робить його ефективним проти збудників інфекцій, бактерій, вірусів та грибів.

Водні розчини препарату прозорі, мають помірний запах оцтової кислоти, не викликають корозії та не пошкоджують широкий спектр матеріалів, таких як нержавіюча і звичайна сталь, скло, полімери, гума, дерево, кахель, силікон та інші. Засіб має добрі миючі та змочувальні властивості, легко змивається, не залишає нальоту, не знебарвлює тканини й не фіксує органічні забруднення.

Для біотехнологічного підприємства «Дезосепт Форте» може використовуватися для регулярного миття та дезінфекції виробничих поверхонь, обладнання та інструментів. Він ефективно видаляє різні види забруднення в тому числі білкові, жирові та залишки лікарських засобів, у тому числі з важкодоступних ділянок — внутрішніх каналів та порожнин.

При використанні необхідно дотримуватись вимог безпеки — працювати в захисному одязі, з використанням засобів захисту шкіри, очей та органів дихання. Після завершення робіт рекомендовано ретельно вимити руки й обличчя водою з милом[42].

Дезінфекційний засіб з мийним ефектом «Інструклін Нью» призначений для використання різних типах виробництва, в тому числі на біотехнологічних і фармацевтичних підприємствах. Він має широкий спектр антимікробної дії — активний проти бактерій, мікобактерій, вірусів, грибків і спор.

Препарат є прозорою рідиною з легким специфічним запахом, добре розчинний у воді та має нейтральне або слаболужне середовище. Робочі розчини мають виражені миючі, дезодоруючі та змочувальні властивості. Засіб не пошкоджує широкий спектр матеріалів (метали, скло, полімери, дерево, гума), не залишає нальоту, легко змивається, не знебарвлює тканини й не фіксує органічні забруднення.

На біотехнологічному виробництві «Інструклін Нью» доцільно використовувати для миття та дезінфекції обладнання, поверхонь і інструментів, зокрема для ефективного видалення білкових і жирових залишків, лікарських препаратів та біологічних рідин із зовнішніх і внутрішніх поверхонь. Засіб

характеризується низькою токсичністю, не подразнює шкіру, але під час аерозольного застосування може викликати подразнення слизових, тому потребує використання засобів індивідуального захисту[43].

Дезінфекційний засіб «Бактодез (Bactodez)» застосовується у біотехнологічній та фармацевтичній промисловості для ефективної очистки обладнання й поверхонь. Має виражену антимікробну дію проти широкого спектра бактерій (включаючи резистентні штами та збудників туберкульозу), вірусів (гепатити, ВІЛ, грип, коронавіруси, тощо) та грибів (у тому числі цвіль і дріжджі).

Засіб випускається у вигляді концентрованої прозорої рідини, має високі миючі (понад 85%), емульгуючі й дезодоруючі властивості, усуває складні забруднення й запахи. Може застосовуватись як у розведеному вигляді, так і нативно для особливо забруднених ділянок. рН розчину — в межах 10,2–11,2 .

«Бактодез» не пошкоджує різні типи матеріалів (метали, полімери, скло, гума, тканини тощо), не викликає корозії, не залишає нальоту, добре змивається. Його безпечно використовувати для делікатного обладнання без ризику порушення механічних з'єднань.

На біотехнологічному підприємстві засіб доцільно використовувати для миття виробничих поверхонь, резервуарів, інструментів та елементів обладнання, що контактують із біологічними матеріалами, зокрема для видалення білкових, жирових та медикаментозних залишків. Під час роботи рекомендовано використовувати захисні рукавички.

Засіб класифікується як малонебезпечний, тому не потребує використання спеціального одягу. Засіб не спричиняє місцевого подразнення, не має шкірно-резорбтивного або сенсibiliзуючого впливу. Не виявлено віддалених побічних ефектів, а також мутагенної, ембріотоксичної, тератогенної, канцерогенної чи гонадотропної дії[44].

Засіб «Мікрасепт (Micrasept)» — готова до використання спиртовмісна рідина з м'якою дією на шкіру, що поєднує антисептичні, очищувальні та знежирювальні властивості. Ефективно усуває білкові, жирові та кров'яні забруднення, не

пошкоджуючи металеві, скляні, пластикові чи гумові поверхні. Не потребує змивання та не залишає нальоту.

Має широку протимікробну активність: знищує грампозитивні та грамнегативні бактерії (включаючи стійкі штами, мікобактерії туберкульозу), віруси (гепатити, ВІЛ, грип, коронавіруси тощо) та патогенні гриби. Активний навіть у присутності білків та інших органічних речовин, зберігає пролонговану антисептичну дію до 3 годин, включно під рукавичками.

На біотехнологічному підприємстві «Мікрасепт» може використовуватись не лише для гігієнічної обробки рук персоналу, а й для швидкої дезінфекції зовнішніх частин обладнання, інструментів, контейнерів і робочих поверхонь, особливо в умовах, де можливе органічне забруднення.

Препарат не чинить подразнюючої або алергічної дії навіть за умов багаторазового використання. Обробка ушкодженої шкіри не впливає негативно на процес загоєння. Засіб не має властивостей накопичення в організмі та не викликає шкідливих віддалених ефектів, таких як мутагенність, ембріотоксичність, тератогенність, канцерогенність чи вплив на репродуктивну функцію[45].

Узагальнююча таблиця характеристики мийно-дезінфікувальних засобів

Закінчення таблицьки 5.1

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
Дезосепт Форте 5 (НВПІ "Дезо" Україна)	надоцтова кислота - 5,0-20,0% пероксид водню - 5,0-10,0% оцтова кислота – 5,0-10,0% стабілізатор - 0,1%;	Бактерицидна Віруліцидна Спороцидна Фунгіцидна	Концентрований дезінфікуючий засіб для дезінфекції будь-яких поверхонь, не призначений для дезінфекції рук.	Засіб безпечний для різних матеріалів — не викликає корозії, не пошкоджує термостійкі й делікатні поверхні, не змінює колір і міцність тканин, не фіксує органічні забруднення, легко змивається та не залишає нальоту чи плям.	Концентрація робочого розчину: 0,1%. Спосіб обробки: механічний ручний	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1649 Дата внесення: 19.09.2023 року. Термін дії до: 19.09.2028 року	1 кг-120 грн	[44, 46]
Інструклін Нью (ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ» Україна)	Комплекс ензимів - протеаза 1,5-2,0%, амілаза - 1,5-2,0%, ліпаза - 1,0-1,5% , ПАР до 4,0% , хелатний комплекс, інгібітор корозії, комплекс для зниження піноутворення	Бактерицидна Віруліцидна Спороцидна Фунгіцидна	Концентрований дезінфекційний засіб, що містить ферменти для відмивання різноманітних поверхонь.	Засіб є безпечним для обробки широкого спектра матеріалів, включаючи як корозійностійкі, так і чутливі до корозії метали, термостабільні й термолабільні матеріали, полімери, скло, дерево, порцеляну та текстиль. Не пошкоджує поверхні медичних приладів, зокрема з лакофарбовим, гальванічним чи полімерним покриттям, не порушує роботу рухомих з'єднань, не знебарвлює тканини, не фіксує органічні забруднення, легко змивається, не залишаючи плям чи нальоту. Підходить для дезінфекції чутливої апаратури,	Концентрація робочого розчину: 0,1% - 0,4%. Спосіб обробки: механічний ручний	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1363 Дата внесення: 27.07.2023 року. Термін дії до: 27.07.2028 року	1 л - 450 грн	[45, 46]

<p>Бактодез (ТОВ «БЛАНІДА С» Україна)</p>	<p>дидецилдиме тиламоніум хлорид 14,0% каустична сода, лимонна кислота, ПАР, інгібітор корозії, допоміжні речовини, вода до 100%.</p>	<p>Бактерицидна Віруліцидна Спороцидна Фунгіцидна</p>	<p>Концентрований засіб для миття та дезінфекції будь-яких поверхонь.</p>	<p>Засіб не викликає корозії металів та безпечний для обробки матеріалів різної хімічної і термічної чутливості, включаючи скло, полімери, гуму, дерево, тканини та чутливі покриття. Не пошкоджує медичне обладнання, не порушує з'єднання та точність вузлів, не змінює структуру і колір матеріалів, не фіксує органічні забруднення, легко змивається та не залишає слідів на поверхні.</p>	<p>Концентрація робочого розчину: 0,25 % - 1%. Після чого, оброблену поверхню ретельно змити проточною водою з розрахунку 100 мл/м² Спосіб обробки: механічний ручний</p>	<p>Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2021 року за №409 Дата внесення: 09.03.2021 року. Термін дії до: 09.03.2026 року</p>	<p>1 л – 171 грн</p>	<p>[44, 46]</p>
<p>Мікрасепт (ТОВ «БЛАНІДА С» Україна)</p>	<p>пропанол-1 (N-пропанол) – 40,0 % пропанол-2 (ізопропанол) – 5,0 % дидецилдиме тиламоніум хлорид - 0,09 % дистильована вода до 100 %.</p>	<p>Бактерицидна Віруліцидна Спороцидна Фунгіцидна</p>	<p>Дезінфікуючий засіб, що використовується для гігієнічної та хірургічної обробки шкіри, а також для швидкої дезінфекції невеликих поверхонь, некритичних медичних виробів.</p>	<p>Засіб має добрі змочувальні, миючі та очищуючі властивості, розчиняє та видаляє різні типи забруднень, в тому числі як механічні так і біологічні, не залишає нальоту.</p>	<p>Проводиться методом протирання або зрошення, витримуючи протягом 15 сек. Не перевищувати 20-30 мл/м² при використанні . Після завершення часу експозиції змивати засіб не обов'язково.</p>	<p>Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2021 року за №1236. Дата внесення: 17.06.2021 року. Термін дії до: 17.06.2026 року</p>	<p>1 л – 264 грн</p>	<p>[45, 46]</p>

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів

Процес одержання такролімусу за участю *Streptomyces tsukubaensis* триває 92 дні, які включають 8 виробничих циклів, та передбачає використання різноманітного обладнання, зокрема інокуляторів об'ємом 7 і 60 літрів, основного ферментера ємністю 630 літрів, а також апаратів для приготування й стерилізації поживного середовища та титрувальних розчинів. Додатково задіяні качалки, стерильні бокси й інше лабораторне оснащення.

Процес організований у спеціалізованих зонах, серед яких – виробничий блок для біосинтезу, лабораторне приміщення з автоклавами, боксами, холодильними установками, термостатами та обладнанням для проведення контролю на різних етапах.

Слід зауважити, що для біотехнологічних виробництв, реалізованих з використанням ферментаційного обладнання великих обсягів (ферментер від 1 м³ і більше), варто орієнтуватися на будівельні норми, тому за ширину будівлі ми приймаємо найближче стандартне значення – 12 м. Довжину будівлі приймаємо кратну довжині стандартних будівельних плит, тобто 6 м. Габаритні розміри основного обладнання наведено у табл. 5.2.

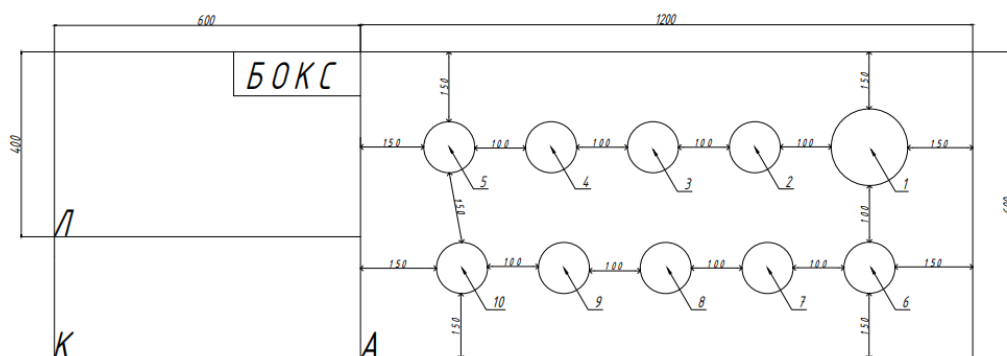


Рис. 5.3. Ескіз плану виробничого приміщення (А – цех підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу; Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками; 1 - виробничий ферментер (ФР-38); 2 - Реактор-змішувач (Р-35); 3- Реактор-змішувач (Р-32); 4- Реактор-змішувач (Р-28); 5- Реактор-змішувач (Р-24); 6- Інокулятор (Р-23); 7- Реактор-змішувач (Р-20); 8 - Реактор-змішувач (Р-16); 9- Інокулятор (І-13); 10 - Реактор-змішувач (Р-10);

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва такролімусу

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м	Джерело
Ферментер(ФР-38)	630	0.8	0.4	[22]
Реактор-змішувач (Р-35) для приготування композиції В	5 л	0.2	0.3	[23]
Реактор-змішувач (Р-32) для приготування композиції Г	10	0.25	0.375	[23]
Реактор-змішувач (Р-28) приготування композиції Б	35	0.450	1.150	[24]
Реактор-змішувач (Р-24) приготування композиції А	300	1.065	1.571	[25]
Інокулятор (І-23)	60	0.4	2	[23]
Реактор-змішувач (Р-20) для приготування композиції Б	3 л	0.2	0.3	[23]
Реактор-змішувач (Р-16) для приготування композиції А	50	0.752	1.400	[26]
Інокулятор (І-13)	7	0.25	0.375	[23]
Реактор-змішувач (Р-10) для приготування композиції А	7	0.25	0.375	[23]
Всього	1107			

Згідно даним *табл. 5.2*, Сумарна місткість ємностей, призначених для культивування посівного матеріалу та проведення основного етапу біосинтезу, дорівнює 1,107 м³.

Для підтримання належного санітарного стану виробничих зон щоденно проводиться вологе прибирання підлоги, що загалом складає 92 цикли очищення за весь процес виробництва. Крім того, тричі протягом цього періоду організовується повне прибирання приміщень, яке охоплює обробку всіх поверхонь виробництва.

Щоб визначити обсяг необхідних мийних і дезінфікуючих засобів, слід врахувати площу підлоги та вертикальних поверхонь (до певної висоти), які підлягають обробці. Частина компонентів поживного середовища подається за

допомогою насосу, тому відповідно до технологічної схеми, основні ємності та ферментери змонтовані на одному рівні.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 72 м^2 ($12 \times 6 \text{ м}$), площа стін – $[(12 \times 2,5) + (6 \times 2,5)] \times 2 = 90 \text{ м}^2$, загальна площа – $72 + 90 = 162 \text{ м}^2$. Загальну площу поверхні обробки мийними засобами наведено у *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м²	Площа стін, м²	Загальна площа, м²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	72	90	162
Мікробіологічна лабораторія	24	50	74
Приміщення з качалками	12	40	52
Загальна площа	108	180	288

Вважаючи на те що передбачувана кількість виробничих циклів з метою отримання біотехнологічним шляхом продукту такролімусу становить 8 та враховуючи, що при проведенні перед кожним з цих циклів проводиться очищення обладнання комунікацій та іншого супровідного обладнання, а також, що по завершенню отримання такролімусу потрібно провести додатковий етап підготовки приміщення, що передбачає повторне миття, то передбачувала кількість процедур складатиме 9. Відповідно узагальнений об'єм площі передбачуваної для миття становитиме:

$$1,107 \times 9 = 9,963 \text{ м}^3$$

Зведені результати розрахунку площ, що підлягають миттю та/або дезінфекції протягом усього виробничого циклу, представлені в таблиці 5.4.

Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період виробництва

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	1 107	9	9 963
Підлога	108	92	9 936
Стіни, двері, вікна	180	3	540

Для проведення санітарної обробки ємнісного технологічного обладнання використовують автоматизовані СІР-системи, які забезпечують ефективне миття. Об'єм робочого мийного розчину зазвичай становить від 20 до 30% від внутрішнього об'єму обладнання. З метою розрахунків доцільно використовувати усереднене значення в межах 25%. Таким чином, для забезпечення миття та дезінфекції обладнання загальним об'ємом 9,963 м³ протягом року необхідно:

$$9,963 \times 0,25 = 2,49 \text{ м}^3 \text{ мийного розчину в рік}$$

Інформацію щодо обраних мийних і дезінфікуючих засобів зведено у таблиці (див. таблицю 2.4), що дозволить порівняти їх за низкою важливих параметрів. При виборі хімічних засобів слід зважати не лише на їхню дезінфекційну та мийну ефективність, безпечність і економічну доцільність, але також на їхню витрату, яка прямо залежить від площі або об'єму поверхонь, що обробляються. Як правило, типовий рівень споживання робочого розчину складає близько 100 мл на кожен квадратний метр очищеної поверхні.

Таблиця 5.5

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва такролімусу

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Дезосепт Форте 5 (надоцтова кислота, пероксид водню, оцтова кислота)	Поверхні приміщень та обладнання	0,1	20 439	2 043,9	120	0,12	245,27
Інструклін Нью (ензими)	Обладнання	0,1	9 963	2 490	450	0,45	1 120,5
Бактодез (дидецилдиметиламоніум хлорид)	Поверхні приміщень та обладнання	0,5	20 439	2 043,9	171	0,86	1 757,75

Згідно з даними, наведеними у таблиці 5.5, серед аналізованих засобів найдоцільнішим варіантом для миття обладнання є препарат «Інструклін Нью», тоді як для очищення поверхонь, а також санітарної обробки стін, дверей, вікон та підлоги оптимальним рішенням виявився «Дезосепт Форте 5». Їх вибір обумовлений мінімальними витратами на весь період виробничого процесу (92 дні), що є важливим критерієм у виробничих умовах, а також підтвердженою ефективністю в роботі.

Окремо варто зазначити, що з метою уникнення формування мікроорганізмів, стійких до дезінфекційних речовин, рекомендується періодична ротація засобів згідно із заздалегідь визначеним графіком. Як правило, чергування здійснюється кожні 1–3 місяці. У разі заміни «Дезосепт Форте 5» можна використовувати засіб «Бактодез». Обидва препарати демонструють співставну ефективність при помітно нижчих витратах і є наступними за вигідністю згідно з економічними розрахунками.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

5.4.1 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно до попередніх розрахунків біосинтез такролімусу за допомогою *S. tsukubensis* відбувається у ферментері з геометричним об'ємом 630 л, що містить 318,8 л поживного середовища. Інокулянт одержують за допомогою трьох етапів: у інокуляторах по 60 та 7 літрів та за допомогою колб на качалках.

Для виробництва такролімусу за допомогою *S. tsukubensis* використовується середовище такого складу (г/л)[16]:

- 40 кукурудзяного крохмалю
- 20 пептону
- 20 глюкози
- 20 соєвого шроту
- 0,025 CuSO₄
- 0,25 MgSO₄
- 1 NaCl
- 3 CaCO₃

Поживне середовище в колбах на качалці стерилізація відбувається за допомогою автоклава. Для стерилізації середовищ, що використовуються в інокуляторах і на етапі промислового біосинтезу, застосовують гостру пару, та підтримують рН на рівні 7...7,5. Усі компоненти після стерилізації подаються в один ферментер, оскільки безперервна стерилізація доцільна лише при об'ємах понад 5 м³. Для стабілізації рН у процесі культивування необхідно передбачити допоміжні операції, зокрема приготування 6 % розчинів хлоридної кислоти та натрій гідроксиду.

Зважаючи на невеликі об'єми солей передбачається приготування розчину солей для всіх етапів технологічного процесу, що наведено у табл. 5.6

Для вибору способу приготування титрувальних розчинів, слід обчислити необхідну кількість кожного компонента для кожного етапу виробництва (табл. 5.7).

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту солей у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст солей, г		
	CuSO ₄	MgSO ₄	NaCl
318,8	7,97	79,7	318,8
35	0,88	8,8	35
3,6	0,09	0,9	3,6
0,4	0,01	0,1	0,4

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовищ

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,4	—	—	—	—
3,6	7,2	у колбі на 50 мл	7,2	у колбі на 50 мл
35	70	у колбі на 250 мл	70	у колбі на 250 мл
318,8	637,6	у колбі на 1 л	637,6	у колбі на 1 л

5.4.2. Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину

Для оптимального процесу біосинтезу є потреба у дробному внесенні глюкозовмісних компонентів, оскільки сумарна кількість всіх компонентів складатиме 80г/л. Процес біосинтезу такролімусу триває 168 годин, відповідно на початку культивування вносять 40% глюкозовмісного поживного середовища. Через 24 години кількість збільшують до 70%, шляхом додавання ще 30%. Останню порцію, яка становить 30%, вносять через 48 годин після попередньої.

Розрахуємо загальну кількість кожного з джерел вуглецю для дробного внесення. Кінцева кількість об'єму поживного середовища складатиме 318,8 л. Сумарна концентрація всіх джерел вуглецю, якими є кукурудзяний крохмаль, соєвий шрот та глюкоза у середовищі культивування продуценту становить 80 г/л.

Якщо враховувати, що спершу вносять 40% глюкозовмісного середовища, тоді вносять 16 г/л кукурудзяного крохмалю та по 8 г/л соєвого шроту та глюкози в 1 л поживного середовища. Отже, у середовище необхідно внести:

$$\text{Кукурудзяний крохмаль} = (318,8 \cdot 16) / 1 = 5100,8 \text{ г} = 5,1 \text{ кг}$$

$$\text{Соєвий шрот та глюкоза} = (318,8 \cdot 8) / 1 = 2550,4 \text{ г} = 2,6 \text{ кожного}$$

Оскільки при використанні дробного внесення на першому етапі використовують 40% від загального об'єму розрахуємо дані розчину(V):

$$5,1 \text{ кг} - 40\%$$

$$X - 100\%$$

$$X = 12,75 \text{ л}$$

$$2,6 - 40\%$$

$$X - 100\%$$

$$X = 6,5 \text{ кожного}$$

На другому та третьому етапі вносять 30% від загального об'єму глюкозовмісного середовища, що відповідно складатиме 12 г кукурудзяного крохмалю та по 6 г соєвого шроту та глюкози. Відповідно у середовище необхідно внести:

$$\text{Кукурудзяний крохмаль} = (318,8 \cdot 12) / 1 = 3825,6 \text{ г} = 3,9 \text{ кг}$$

$$\text{Соєвий шрот та глюкоза} = (318,8 \cdot 6) / 1 = 1912,8 \text{ г} = 1,9 \text{ кг кожного}$$

Оскільки при використанні дробного внесення на першому етапі використовують 30% від загального об'єму розрахуємо дані розчину(V):

3,9-30%

X-100

X=13л

1,9 - 30%

X- 100%

X = 6,3 л кожного

Сумарно об'єм дробного внесення складатиме 70,45 л підживлюючого розчину, найближчим стандартним ферментером є ферментер на 100л. Підготовка та стерилізація розчину відбувається в окремому реакторі. Спершу відбувається заварювання соєвого шроту та кукурудзяного крохмалю та потім додають глюкозу, після цього відбувається стерилізація при температурі 112 °С протягом 30 хв.

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Оскільки об'єм середовища при культивування на колбах на качалці становить 400 мл, стерилізація даного середовища здійснюватиметься в автоклаві.

Для приготування та стерилізації середовища, компоненти розбивають на такі композиції:

Композиція А: кукурудзяний крохмаль та соєвий шрот (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,15 МПа).

Композиція Б: глюкоза та пептон(режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: сульфат купруму, сульфат магнію, хлористий натрій (режим стерилізації: 131 °С, 50 хв, 0,15 МПа).

Композиція Г: кальцій карбонат (режим стерилізації: 131 °С, 50 хв, 0,15 МПа).

Кукурудзяний крохмальна та соєвий шрот – термолабільні компоненти, тому потребують м'якших умов стерилізації та попереднього заварювання на водяній бані. Глюкозу та пептон теж являються термолабільними компонентами, але оскільки для їхньої підготовки не потрібне заварювання їх відносять в іншу композицію.

Сульфат купруму, сульфат магнію, хлористий натрій стерилізують при стандартній для солей температурі та готують з них розчин солей, що в подальшому буде використовуватися у решті стадіях підготовки. Кальцій карбонат стерилізують окремо, оскільки є можливість утворення нерозчинних солей кальцію

Таблиця 5.8

Розрахунок кількості компонентів в поживному середовищі в колбах на качалці об'ємом 400мл:

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяний крохмаль	40	16	А	200
Соевий шрот	20	8		
Вода	200 (мл)			
Глюкоза	20	8	Б	150
Пептон	20	8		
Вода	150(мл)			
CuSO ₄	0,025	0,01	В	10
MgSO ₄	0,25	0,1		
NaCl	1	0,4		
Вода	10(мл)			
CaCO ₃	3	1,2	Г	40
Вода	40(мл)			

5.4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокулянту в посівному апараті об'ємом 7л.

На цьому етапі потрібно підготувати 3,6 л поживного середовища. Його склад та умови стерилізації відповідають зазначеним у пункті 5.4.2. Спочатку готують композицію А шляхом заварювання, після чого до неї додають композицію Б і здійснюють стерилізацію в окремому реакторі-змішувачі. Композиції В і Г готують окремо в колбах і стерилізують в автоклаві з метою зниження ризику мікробного забруднення.

Розрахунок кількостей інгредієнтів, необхідних для приготування поживного середовища з метою вирощування посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 7 л, наведено в табл. 5.9

Розрахунок кількості компонентів в поживному середовищі в посівному апараті об'ємом 7 л:

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяний крохмаль	40	144	А	3725
Соевий шрот	20	72		
Вода	3386(мл)			
Конденсат	338,6 мл		Б	165
Глюкоза	20	72		
Пептон	20	72		
Вода	150(мл)			
Конденсат	15			
CuSO ₄	0,025	0,09	В	60
MgSO ₄	0,25	0,9		
NaCl	1	3,6		
Вода	60 (мл)			
CaCO ₃	3	10,8	Г	100
Вода	100(мл)			

Вирощування інокулянту в посівному апараті об'ємом 60л.

Для цього етапу потрібно 35 л поживного середовища. Його склад і умови стерилізації відповідають описаним у пункті 5.4.2. Композицію А спочатку заварюють, після чого до неї додають композицію Б, і отриману суміш стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію В готують у лабораторній колбі, а композицію Г — у спеціальних збірниках; стерилізацію цих компонентів проводять безпосередньо в інокуляторі з метою мінімізації ризику контамінації.

Розрахункові дані щодо необхідних кількостей компонентів для приготування середовища в посівному апараті об'ємом 60 л наведено в табл. 5.10.

Таблиця 5.10.

**Розрахунок кількості компонентів в поживному середовищі в інокуляторі
об'ємом 60 л:**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 35 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	40	1 400	А	32,28
Соевий шрот	20	700		
Вода		39,25л		
Конденсат		2,9 мл		
Глюкоза	20	700	Б	1,65
Пептон	20	700		
Вода		1500 мл		
Конденсат		150 мл		
CuSO ₄	0,025	0,875	В	0,3
MgSO ₄	0,25	8,75		
NaCl	1	35		
Вода		300 мл		
CaCO ₃	3	105	Г	0,77
Вода		700 мл		
Конденсат		70 мл		

5.4.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу такролімусу

На даному етапі необхідно 318,3 л поживного середовища. Оскільки об'єм менше 5 м³ замість установки безперервної стерилізації використовуємо стерилізацію вологою парою.

Спочатку у реакторі–змішувачі заварюються кукурудзяний крохмаль та соєвий шрот, після чого додаються глюкоза з пептоном та стерилізуються. Розчин солей та композиція Г готуються кожен в окремому збірнику після чого порційно подається у ферментер.

У табл. 6 подано результати розрахунку кількості компонентів, необхідних для приготування живильного середовища, що використовується під час виробничого біосинтезу у ферментері місткістю 630 л.

Таблиця 5.11

**Розрахунок кількості компонентів в поживному середовищі у ферментері
об'ємом 630 л:**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 318,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	40	12 752	А	292,4
Соевий шрот	20	6 376		
Вода		266,73л		
Конденсат		26,67 л		
Глюкоза	20	6 376	Б	16,5
Пептон	20	6 376		
Вода		15 л		
Конденсат		1,5 л		
CuSO ₄	0,025	7,97	В	2,2
MgSO ₄	0,25	79,7		
NaCl	1	318,8		
Вода		2 л		
Конденсат		0,2 л		
CaCO ₃	3	956,4	Г	7,7
Вода		7 л		
Конденсат		0,7 л		

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведено у табл. 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник великий з дефлектором Матеріал: високоякісний пластик Внутрішні розміри: Д 857 х В 388 мм Зовнішні розміри: Д 908 х В 454 мм Вага: 7,20 кг Продуктивність від 10 до 40 Па Наявність ізоляції від птахів та гризунів, дефлектор, можливість регулювання відкриття DEYARDA (Україна) [47]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Кишеньковий фільтр грубого очищення G3-G4 фільтруючий матеріал: 100% поліестр; товщина матеріалу 8 мм; пилоємність – 290 г/см2. Айсклімат(Україна)[48]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Mast SH-8 Потужність двигуна 5,5 кВт; габаритні розміри 750x600x820 мм; продуктивність повітря 690 л/хв; Тиск повітря: 10 бар VELESTOOL(Україна) [49]
Т-4, Т-6	Теплообмінний апарат	2	Пластинчастий теплообмінник THERMAKS PTA (GC) Робоче середовище -вода, гліколь, рідини, масло, молоко, пара; робочий тиск - 0,16МПа; виконання з'єднань - фланцеве ОПЕКС(Україна) [50]
Р-5	Ресивер	1	Повітрозбірник, ресивер для стисненого повітря Максимальний робочий тиск: 10 бар, робочий об'єм: 2м3 Має кран для зливу конденсату, запобіжний клапан та манометр.[39]
Ф-7	Тонкий фільтр	1	Фільтр кишеньковий HVAC F9 фільтруючий матеріал: синтетичні волокна; електростатичне волокно; працює за 100% вологості Healthy filter (Китай)[51]
ІФ-12 ІФ-22 ІФ-37	Індивідуальний фільтр	3	Однофланцевий фільтр SAF-F14 Фільтруючий матеріал: поліпропіленове волокно; опір повітря <220 Па; ефективність очистки 99,99% SAF-airfilters(Китай) [52]

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.3	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Федорчук А.О				РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.	Удимович В.М.						62	98
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.								
Затверд.	Стабніков В. П.							

Н-11 Н-17 Н-21 Н-25 Н-29 Н-33 Н-36 Н-39	Насос мембранний	8	Мембранний насос дозатор Подача насосу (л/год): 1.6-16000; потужність насосу (кВт): 0.25-7.5 Vikaqua (Україна) [53]
Д-8 Д-9 Д-14 Д-15 Д-18 Д-19 Д-26 Д-27 Д-30 Д-31 Д-34	Об'ємно-ваговий дозатор	11	Ваговий дозатор FLEX W40 Точність дозування від 0,5% до 2,5% продуктивність до 2000кг/год габаритні розміри 2150x580x750 мм Flexmash (Україна) [54]
3-10	Збірник для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач JSR-B -5B Матеріал: нержавіюча сталь Діапазон температури: 20-250С Швидкість обертання: до 600 об/хв Тиск: -0,1-0,6МПа Наявні датчики рН, тиску, температури та наявна можливість замовити датчики під замовлення Lab1st (Китай)[55]
I-13	Інокулятор	1	AL-100: Benchtop AirLift BioReactor Вбудований регулятор тиску, датчики контролю рН, оптичної густини та температури; Можливість зробити ферментер під замовлення bioreactors.net(Латвія) [56]
3-16	Збірник для приготування композиції А	1	Збірник С-50 Матеріал: Сталь AISI 316 L Потужність: 0,03 кВт Габаритні розміри: 752x500x1400 мм Маса: 66 кг Промвіт(Україна)[57]
3-20	Збірник для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач JSR-B -3B Матеріал: нержавіюча сталь Діапазон температури: 20-250С Швидкість обертання: до 600 об/хв Тиск: -0,1-0,6МПа Наявні датчики рН, тиску, температури та наявна можливість замовити датчики під замовлення Lab1st (Китай)[55]

I-23	Інокулятор 60	1	AL-200: AirLift Pilot Scale BioReactor Вбудований регулятор тиску, датчики контролю рН, оптичної густини, рівня рідини та температури Габаритні розміри залежать від вибраного розміру ферментеру під замовлення. bioreactors.net(Латвія) [58]
3-28	Збірник для приготування композиції А	1	Збірник СМ-350 Матеріал: Сталь AISI 316 L Потужність: 0,03 кВт Габаритні розміри: 1065x796x1571 мм Маса: 90 кг Промвіт(Україна)[59]
3-32	Збірник для приготування композиції Б		Реактор-змішувач SSR-20L Матеріал: нержавіюча сталь Швидкість обертання: 30-140 об/хв Робочий об'єм: до 50 л Габаритні розміри: 450x450x1150 Наявні датчики температури, тиску, можливість встановлення датчиків на замовлення Вага: 130 кг Made-in-China(Китай)[60]
3-35	Збірник для приготування композиції Г	1	Реактор-змішувач JSR-B -10B Матеріал: нержавіюча сталь Діапазон температури: 20-250С Швидкість обертання: до 600 об/хв Тиск: -0,1-0,6МПа Наявні датчики рН, тиску, температури та наявна можливість замовити датчики під замовлення Lab1st (Китай)[55]
3-24	Збірник для розчину солей	1	Реактор-змішувач JSR-B -5B Матеріал: нержавіюча сталь Діапазон температури: 20-250С Швидкість обертання: до 600 об/хв Тиск: -0,1-0,6МПа Наявні датчики рН, тиску, температури та наявна можливість замовити датчики під замовлення Lab1st (Китай)[55]
ФР-38	Ферментер	1	Ерліфтний ферментер Матеріал: нержавіюча сталь Резервуар 0,3 МПа, кожух 0,4 МПа; вбудована стерилізація автоклавом, датчики тиску, аерації, температури та рН. Габаритні розміри залежать від об'єму ферментеру, співвідношення діаметру до висоти: 1:5. lab1st(Китай)[61]

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.

Технологічна схема біосинтезу такролімусу включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря та поживного середовища) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез такролімусу за допомогою *Streptomyces tsukubensis*).

ДР 1 Підготовка повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється через повітрозбірники на даху будівлі (повітрозабірник знаходиться на висоті від верхньої межі даху на висоті 3 метри; загальна висота від землі 10 м)

ДР 1.2. Очищення повітря через фільтр грубої очистки

Очистка повітря за допомогою грубого фільтру проводиться з метою очищення від великих часточок домішок та пилу. Ступінь очищення становить приблизно 80%.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Компресування повітря відбувається при тиску 0,35 МПА та при температурі приблизно 180°C за для забору більшого об'єму повітря, його первинного очищення та подальшого зручного фільтрування.

ДР 1.4. Стабілізація термолабільних показників

За для стабілізації термолабільних показників здійснюють охолодження у спеціальному охолоджувачі до температури 20°C та видаляють зайву вологу.

ДР 1.5 Нагрівання повітря

Нагрівання попередньо охолодженого повітря відбувається у повітронагрівачі до 50°C .

ДР 1.6. Очищення повітря на тонкому фільтрі

Очистка повітря за допомогою тонкого фільтру від дрібних часточок та мікроорганізмів. Як тонкий фільтр використовують поліакринітрильне волокно,

	товщина - 1,5-2,1	мкм.	Ступінь	очистки становить 95-97%[31].				
					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Федорчук А.О				РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.	Удимович В.М.						65	98
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.								
Затверд.	Стабніков В. П.							

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Очищення повітря відбувається за допомогою індивідуального фільтру. Ступінь очистки становить 99,99%. Як індивідуальний фільтр використовують скляну вату, діаметром не більше 1-2 мкм. Використовують перед інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером. [30]

ДР 2. Приготування та стерилізація титруючих розчинів

ДР 2.1 Приготування 6% - го розчину HCl.

Розчин виготовляють у збірнику, додаючи питної води використовуючи дозатор та за умови постійного перемішування додають розчину HCl. Отримують 6% розчину соляної кислоти.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH

Готують у збірнику, додаючи за допомогою дозатора NaOH та питної води. Отримують 6% розчину NaOH. Стерилізують при 131°C, впродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування, заварювання та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Для приготування та стерилізації середовища, компоненти розбивають на такі композиції:

Композиція А: кукурудзяний крохмаль та соєвий шрот.

Композиція Б: глюкоза та пептон.

Композиція В: сульфат купруму, сульфат магнію та хлористий натрій.

Розрахунок кількості компонентів в поживному середовищі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяний крохмаль	40	16	А	200
Соєвий шрот	20	8		
Вода	200 (мл)			
Глюкоза	20	8	Б	150
Пептон	20	8		
Вода	150(мл)			
CuSO ₄	0,025	0,01	В	10
MgSO ₄	0,25	0,1		
NaCl	1	0,4		
Вода	10(мл)			
CaCO ₃	3	1,2	Г	40
Вода	40(мл)			

ДР 3.1.1 Приготування, заварювання та стерилізація композиції А

На лабораторних вагах спочатку встановлюють і тарують мірний стакан. Після цього зважують 16 г кукурудзяного крохмалю та 8 г соєвого шроту, які по черзі додають у стакан. Отримані наважки переносять у колбу, доливають 200 мл питної води й витримують при температурі 50–60 °С упродовж 30 хвилин для заварювання. Після завершення процесу ємність закривають ватно-марлевою пробкою і проводять стерилізацію в автоклаві при 112 °С протягом 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На лабораторних вагах встановлюють та відтаровують мірний стакан. Опісля почергово відбирають та почергово зважують 8 г глюкози та 8 г пептону. Відважені порції вносять у колбу додаючи 150 мл води. Колбу накривають ватно-марлевою пробкою і піддають стерилізації в автоклаві за температури 112 °С упродовж 30 хвилин.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

Зважаючи на невеликі об'єми компонентів композиції В, передбачається приготування розчину мікроелементів для всіх етапів накопичення посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.

Для приготування розчину солей на вагах зважують 0,01 г, 0,1 та 0,4 г відповідно CuSO_4 , MgSO_4 , NaCl . Наважки переносять у стерильну термостійку колбу додають 10 мл питної води. Колбу щільно закривають ватно-марлевою пробкою та вносять на перемішувач та переносять в автоклав при температурі 131 °С протягом 50 хвилин.

ДР 3.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На лабораторних вагах встановлюють мірний стакан і проводять його тарування. Далі послідовно відбирають і зважують по 1,2 г кальцію карбонату. Кожну порцію додають у колбу, після чого вливають 40 мл води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С протягом 50 хвилин.

ДР 3.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокулянту в інокуляторі об'ємом 7л

Таблиця 7.2

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяний крохмаль	40	144	А	3725
Соевий шрот	20	72		
Вода	3386(мл)			
Конденсат	338,6 мл			
Глюкоза	20	72	Б	150
Пептон	20	72		
Вода	150(мл)			
CuSO_4	0,025	0,09	В	60
MgSO_4	0,25	0,9		
NaCl	1	3,6		
CaCO_3	3	10,8	Г	100
Вода	100(мл)			

ДР 3.2.1 Приготування, заварювання та стерилізація композиції А

На лабораторних вагах встановлюють та відтаровують мірний стакан. Після почергово відбирають та зважують почергово 144 г кукурудзяного крохмалю та 71 г соєвого шроту. Наважки вносять у збірник, додаючи 3,386 л питної води,

компоненти заварюють при 50-60 °С протягом 30 хв, вмикають перемішуючий пристрій до розчинення. Стерилізують при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На лабораторних вагах встановлюють та відтаровують мірний стакан. Після почергово відбирають та зважують почергово 72 г глюкози та пептону. Наважки вносять у колбу та закривають ватно-марлевою пробкою, додаючи 150 мл питної води, вмикають перемішуючий пристрій до розчинення. Стерилізують при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

ДР 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

На лабораторних вагах встановлюють та відтаровують мірний стакан. Після почергово відбирають та почергово зважують 0,09 г CuSO_4 , 0,9 г MgSO_4 та 3,6 г NaCl . Відважені порції вносять у колбу додаючи 60 мл води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С протягом 50 хвилин

ДР 3.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На лабораторних вагах встановлюють мірний стакан і проводять його тарування. Далі послідовно відбирають і зважують по 10,8 г кальцію карбонату. Кожну порцію вносять у збірник, після чого вливають 100 мл води після чого вносять порції з інших етапів та вмикають перемішуючий пристрій до розчинення. Стерилізують при температурі 131 °С протягом 50 хвилин.

ДР 3.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокулянту в посівному апараті об'ємом 60 л

Таблиця 7.3

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 35 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	40	1 400	А	32,28
Соєвий шрот	20	700		
Вода		39,25л		
Конденсат		2,9 мл		
Глюкоза	20	700	Б	1,65
Пептон	20	700		
Вода		1500 мл		
Конденсат		150 мл		
CuSO ₄	0,025	0,875	В	0,3
MgSO ₄	0,25	8,75		
NaCl	1	35		
CaCO ₃	3	105		
Вода		700 мл	Г	0,77
Конденсат		70 мл		

ДР 3.3.1 Приготування, заварювання та стерилізація композиції А

Для приготування розчину крохмалю та соєвого шроту за допомогою об'ємно-ваговий дозатора у відкриту металеву ємність додають 1,4 кг кукурудзяного крохмалю та 0,7 кг соєвого шроту, перемішуючи за допомогою мішалки додають 39,25 л питної води та заварюють при 50-60 °С протягом 30 хв. Розчин переносять в апарат для стерилізації об'ємом 100л. Стерилізація відбувається при температурі 112 °С протягом 30 хвилин

ДР 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування композиції Б за допомогою об'ємно-ваговий дозатора у відкриту металеву ємність додають по 0,7 кг глюкози та пептону, додають 1,5 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій до розчинення компонентів. Розчин переносять в апарат для стерилізації. Стерилізація відбувається при температурі 112 °С протягом 30 хвилин

ДР 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В

На лабораторних вагах встановлюють та відтаровують мірний стакан. Опісля почергово відбирають та зважують почергово 0,875 г сульфату купруму, 8,75 г сульфату магнію та 35 г хлориду натрію. Наважки вносять у збірник, додаючи 300

мл питної води, перемішуючий пристрій до розчинення. Стерилізують при температурі 131 °С протягом 50 хвилин.

ДР 3.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На лабораторних вагах встановлюють мірний стакан і проводять його тарування. Далі послідовно відбирають і зважують по 105 г кальцію карбонату. Кожну порцію вносять у збірник, після чого вливають 700 мл води після чого вносять порції з інших етапів та вмикають перемішуючий пристрій до розчинення. Стерилізують при температурі 131 °С протягом 50 хвилин.

ДР 3.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокулянту в ферментері об'ємом 630 л

Таблиця 7.4

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 318,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	40	12 752	А	292,4
Соевий шрот	20	6 376		
Вода	266,73л			
Конденсат	26,67 л			
Глюкоза	20	6 376	Б	16,5
Пептон	20	6 376		
Вода	15 л			
Конденсат	1,5 л		В	2,2
CuSO ₄	0,025	7,97		
MgSO ₄	0,25	79,7		
NaCl	1	318,8		
CaCO ₃	3	956,4	Г	7.7
Вода	7 л			
Конденсат	0,7 л			

ДР 3.4.1 Приготування, заварювання та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-ваговий дозатору у відкриту металеву ємність вносять попередньо відважені 12,752 кг кукурудзяного крохмалю 6,376 кг соєвого шроту та 266,73 л питної води. Суміш заварюють при 50-60 °С протягом 30 хвилин. Розчин перемішують механічним пристроєм та стерилізують гарячою парою при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

ДР 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-ваговий дозатору у відкриту металеву ємність вносять по 2 6,376 кг глюкози та пептону, додаючи 15 л питної води. Суміш перемішують та стерилізують за незмінних умов. вмикають перемішуючий пристрій до розчинення компонентів.

Розчин перемішують механічним пристроєм та стерилізують гарячою парою при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

ДР 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину солей на лабораторних вагах встановлюють та відтаровують мірний стакан. Після по чергово відбирають та по чергово зважують 7,97 г купрум сульфату, 79,7 г магній сульфату та 318,8 г хлористого натрію, суміш переносять у збірник та додають 2 л питної води, після чого ретельне перемішують за допомогою перемішують механічним пристроєм та стерилізують гарячою парою при температурі 131 °С протягом 50 хвилин.

ДР 3.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На лабораторних вагах встановлюють мірний стакан і проводять його тарування. Далі послідовно відбирають і зважують по 956,4 г кальцію карбонату. Кожну порцію вносять у збірник, після чого вливають 7 л води після чого вносять порції з інших етапів та вмикають перемішуючий пристрій до розчинення. Стерилізують при температурі 131 °С протягом 50 хвилин.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури.

Колекційну культуру *Streptomyces tsukubensis* зберігають у пробірках на скошеному агаризованому середовищі з м'ясо-пептонним бульйоном За температури 2-4°С. Здійснюються пересіви кожні 3-4 місяці з метою підтримки чистоти культури пересіви здійснюють. Всі роботи проводять у стерильних умовах

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру наносять за допомогою бактеріологічної петлі на поверхню м'ясо-пептонного агару в чашках Петрі та інкубують за температури 28 °С протягом двох діб.

ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані після інкубації колонії акуратно пересідають у пробірки, які містять скошений м'ясо-пептонний агар. Подальше культивування проводять за температури 28 °С впродовж 24 годин для отримання активної культури.

ТП 4.4. Вирощування інокулянту в колбах на качалках

У попередньо простерилізовані колби переносять поживне середовище. У пробірку з робочою культурою вносять фізіологічний розчин, проводять змивання культури і вносять у колбу з стерильним поживним середовищем. Роботи проводяться у асептичних умовах.

Посівний матеріал вирощують 36 год на качалці, в якій встановлюють 250 об/хв. Отриману культуру піддають мікробіологічному контролю та визначають об'єм накопиченої біомаси.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі.

Попередньо стерилізують інокулятор та поживне середовище. У інокулятор з внесеним поживним середовищем додають вирощений у колбах посівний матеріал. Використовують мішалку з обертами 250 об/хв. Піногасіння здійснюється механічними піногасниками. Культивування відбувається при рН 7,5±0,1, температурі 28±0,5° С протягом 72 год. з постійною подачею аераційного повітря. Одержану культуру піддають перевірці на контамінацію та рівень біомаси.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті.

Посівний апарат попередньо стерилізують, вносять поживне середовище. Попередньо приготовлену культуру в колбах на качалці додають до апарату. Використовують мішалку з обертами 250 об/хв. Піногасіння здійснюється механічними піногасниками. Культивування відбувається при рН 7,5, температурі 28 °С протягом 72 год. з постійною подачею аераційного повітря.

Здійснюють мікробіологічний контроль одержаної культури та визначають рівень біомаси.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1 м³

Заздалегідь простерилізують ферментер об'ємом 630 л та компоненти поживного середовища. Спершу вносять композицію Б, порційно додаючи композицію А та В, вносять посівну культуру. Вмикають перемішуючий пристрій на 250 об/хв та вмикають аерацію простерилізованим повітрям. Піногасіння здійснюється за допомогою хімічного піногасника. Біосинтез відбувається при рН 7.5, аерацію здійснюють при 1 л/л, а реакцію поживного середовища регулюють титруючими розчинами, рівень рН контролюється на рН-метрі. Культивування здійснюється впродовж 168 год за температури 28-30 ° С, концентрація цільового продукту повинна складати 1,522 мг/л. Під час проведення біосинтезу кожні 6-8 годин відбирають проби культуральної рідини з метою перевірки мікробіологічної чистоти, показників росту та кількості синтезованого продукту.

РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту

Існує кілька підходів до виділення такролімусу, серед яких застосування силікагелю, зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та інші. Однак ці методи характеризуються низкою істотних недоліків, таких як складність процедур, значна тривалість обробки та високе споживання органічних розчинників. У зв'язку з цим актуальним постає питання розробки ефективнішого методу його очистки. Одним із перспективних рішень є використання модифікованого нанорозмірного полімерного адсорбенту, що дозволяє досягти виходу до 90% цільової речовини.

Процес виділення такролімусу має особливе значення через супутній синтез структурно подібних домішок, таких як аскоміцин і дигідротакролімус, що ускладнює їхнє відділення через наявність спільного макролідного лактону. Деякі дослідники пропонують методики, що забезпечують високу селективність та ефективність розділення зазначених сполук.

Експериментальні підходи передбачають використання модифікованих адсорбентів з метою підвищення ефективності розділення компонентів. У рамках запропонованої методики після отримання ферментаційного бульйону міцелій відокремлюється за допомогою фільтр-пресу, після чого отриманий супернатант піддається екстракції, яка здійснюється тричі протягом трьох циклів. Екстракт після цього піддається адсорбції та подальшій десорбції з метою остаточного відділення цільової сполуки від домішок. Органічний екстракт концентрується у вакуумі до утворення маслянистого залишку, який потім кристалізується.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.23 4Р ПЗ</i>			
<i>Змн.З</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум. докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	<i>Літ..</i>	<i>Арк..</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Федорчук А.О</i>						75	98
<i>Перевір.</i>	<i>Удимович В.М.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр. Н.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В. П.</i>							

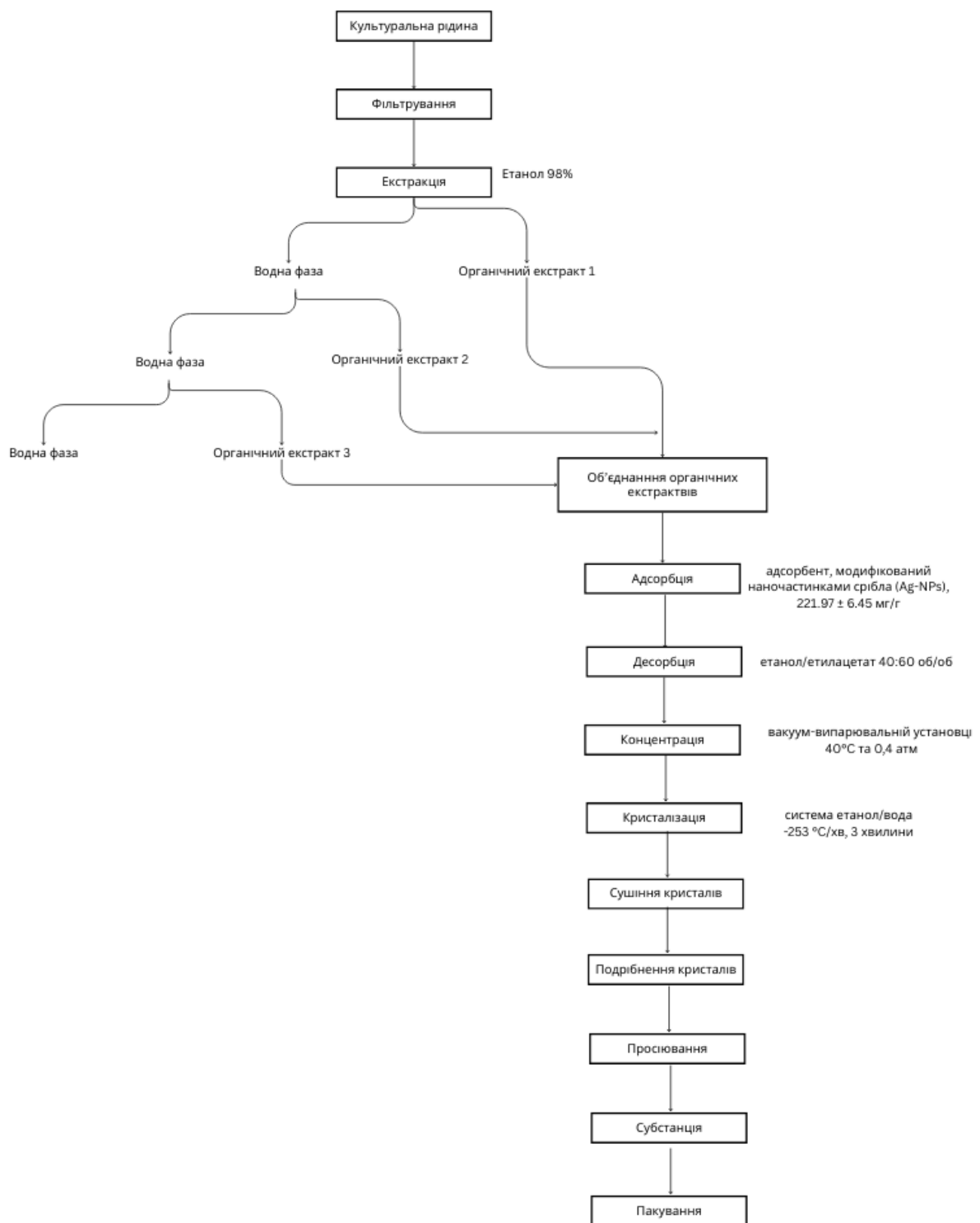


Рис.3.1. Схема виділення та очищення продукту

Фільтрація в даному випадку виконує роль первинного етапу очищення культурального середовища, що містить як рідкі, так і тверді компоненти. Основною

метою цього етапу є відокремлення біомаси від рідкої фази, що містить такролімус. Процес фільтрації реалізується з використанням фільтр-пресу – апарата, який забезпечує ефективне механічне розділення двох фаз: твердої (осаду) та рідкої (супернатанту), що дозволяє отримати прозорий фільтрат, придатний для подальшої обробки.

Отриманий після фільтрації супернатант піддається подальшій обробці методом екстракції. У цьому дослідженні екстракцію здійснювали з використанням 98% етанолу — полярного органічного розчинника, який ефективно витягує такролімус із водної фази.

Процедура екстракції реалізується у декілька послідовних етапів, кожен з яких спрямований на максимальне вилучення такролімусу. На першому етапі супернатант змішують з етанолом. Після перемішування утворюється двофазна система, де органічна фаза (етанол) містить розчинений такролімус, тоді як водна фаза залишається після часткового вилучення речовини. Після повного розділення фаз органічну частину обережно відокремлюють. Процедуру повторюють ще двічі, кожного разу додаючи нову порцію етанолу до залишкової водної фази. Це дозволяє досягти високого ступеня вилучення такролімусу, мінімізуючи його втрати.

Після завершення етапів екстракції, органічну фазу піддають адсорбційній обробці з використанням спеціального адсорбенту, модифікованого наночастинками срібла (Ag-NPs), які покращують селективність і ємність сорбенту. Процес адсорбції триває близько 25 хвилин — цього часу достатньо для досягнення адсорбційної рівноваги, тобто стану, коли кількість такролімусу, що адсорбується, дорівнює кількості, що десорбується. Після завершення адсорбції смола з адсорбованим такролімусом фільтрують та промивають етилацетатом, що дозволяє ефективно відокремити речовину від сорбенту.

Органічний екстракт, об'єднаний після усіх циклів екстракції та десорбції, далі концентрують методом вакуумного випарювання. Для цього використовують спеціалізовану установку, яка дозволяє здійснювати випарювання розчинника за зниженого тиску. У результаті випарювання з розчину усувається основна частина

етанолу, й утворюється залишок у вигляді маслянистої субстанції з високим вмістом такролімусу [62].

Кінцевим етапом виділення такролімусу є кристалізація. Процес проводять у системі розчинників етанол-вода, де досягається стан перенасичення, необхідний для початку нуклеації – утворення первинних кристалів. Охолодження проводили зі швидкістю $-253\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, що тривало близько 3 хвилин. Така інтенсивна швидкість зниження температури сприяє швидкому перенасиченню розчину, скорочує час індукції – період, необхідний для появи перших кристалічних зародків, і, відповідно, покращує контроль над розміром і морфологією кристалів.

Упродовж усього процесу розчин перемішували при 400 об/хв, що забезпечувало однорідність системи та сприяло рівномірному утворенню кристалів. Появу кристалів контролювали візуально за допомогою визначення ступеня прозорості розчину: момент кристалізації фіксували тоді, коли прозорість помітно знижувалася. Після завершення процесу утворені кристали ретельно відокремлювали шляхом фільтрації, промивали для видалення залишків розчинника, висушували та подрібнювали до однорідної гранульованої маси, що значно полегшує подальше дозування та аналіз.[63].

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

9.1. Мікробіологічний контроль

Для оцінки чистоти посівного матеріалу проводять його мікробіологічний контроль. Цей процес передбачає посів невеликої кількості культури на поживні середовища з м'ясо-пептонним та сусло-агар для виявлення бактерій та грибів з дріжджами відповідно.

Методом послідовних штрихів шпателем Дригальського по поверхні агару розподіляють культуральну рідину та інкубують при температурі 30-32°C протягом доби-двох.

Мікроскопіювання для дослідження морфологічних особливостей клітин використовують світловий мікроскоп з імерсійною системою. Для приготування мікропрепарату невелику кількість клітин з колонії переносять на чисте предметне скло за допомогою мікробіологічної петлі наносять невелику кількість проби посівного матеріалу. Мазок фіксують до повного випаровування вологи, потім на препарат наносять 1-2 краплі імерсійної олії та мікроскопіюють. Після завершення мікроскопіювання олію видаляють за допомогою фільтрувального паперу, змоченого спиртом [20, 15].

Під час мікроскопіювання, за умови відсутності контамінації, спостерігають клітини бактерії *Streptomyces tsukubaensis*. Штам продукує повітряний міцелій та гнучкі спорові ланцюжки з гладенькою поверхнею. Форма спор циліндрична, діаметром 0,5–0,7 мкм, довжиною 0,7–0,8 мкм [15].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ</i>			
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	Літ..	Арк..	Аркушів
Розроб.		Федорчук А.О					79	98
Перевір.		Удимович В.М.						
Реценз.								
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В. П.				<i>Кафедра БТМ</i>		

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ.

Для перевірки стерильності поживного середовища проводиться прямий посів. Відбираємо невелику кількість уже простерилізованого середовища (зазвичай 20-50 мл) і пересіваємо її на спеціальні чашки Петрі з поживним агаром. Для виявлення грибів і дріжджів використовується сусло-агар, а для бактерій – м'ясо-пептонний агар.

Далі, за допомогою стерильної піпетки, відбираємо зовсім частину проби (0,1 мл) і розподіляємо її по поверхні агару за допомогою шпателя Дригальського. Після цього чашки поміщаємо в термостат з оптимальною температурою для росту мікроорганізмів (30-32 °С).

Кожні 6-8 годин проводимо візуальний огляд чашок Петрі. Якщо на агарі відсутні будь-які колонії мікроорганізмів, це свідчить про те, що початкове поживне середовище було стерильним.

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Концентрація біомаси

Визначення концентрації біомаси здійснювали за допомогою висушування та зваження відібраного зразку.

Необхідні матеріали та реактиви:

Ферментаційний бульйон

Стерилізатор

Ацетон

Умови проведення визначення:

Відбирали 10 мл ферментаційного бульйону за допомогою стерильної піпетки та переносили у колбу. Після чого повільно додавали 10 мл ацетону постійно перемішуючи для того, щоб завершити ферментацію.

Отриманий вміст відфільтровують за допомогою фільтрувального паперу. Після клітини, що лишилися на фільтрувальному папері промивають деіонізованою водою та витримують при 80 °С протягом 1-2 годин у сушильній шафі. Далі отриманий вміст зважують на лабораторних вагах з точністю до 0,0001 г [41, 15].

Метод обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (rReversed-phase high performance liquid chromatography).

Принцип методу

Метод обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії базується на використанні колонкової хроматографії з використанні оберненої фази, де нерухлива фаза є неполярною, а рухлива фаза складається з води та розчинника з використанням високого тиску та ідентифікації за допомогою спектрофотометрії. [15, 16]

9.2.2. Концентрація цільового продукту

Метод обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (rReversed-phase high performance liquid chromatography).

Принцип методу

Метод обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії базується на використанні колонкової хроматографії з використанні оберненої фази, де нерухлива фаза є неполярною, а рухлива фаза складається з води та розчинника з використанням високого тиску та ідентифікації за допомогою спектрофотометрії. [15, 16]

Перелік необхідних матеріалів та реактивів:

FK506

Поліоксиетиленовий ефір лаурилового спирту (Brij-35)

Умови проведення визначення:

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- Колонка AkzoNobel Kromasil 100-5-C18 4,0 мм x 250 мм
- температура термостату: 60 С
- рухома фаза: деіонізована вода 0,1% фосфорної кислоти з ацетонітрилом (33:67, об/об)
- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі: 215 нм;
- об'єм проби, що вводиться: 20 мкл;

Культуральну рідину розбавляли подвійним об'ємом етанолу. З метою підвищення ефективності екстракції суміш піддавали ультразвуковій обробці протягом 30 хвилин при частоті 50 Гц. Отриманий супернатант центрифугували для відділення твердих частинок, а потім фільтрували через мембранний фільтр з розміром пор 0,22 мкм.

Для подальшого очищення та кількісного визначення цільових сполук використовували обернено-фазову високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) на колонці Kromasil 100-5-C18. Розділення проводили за ізократичного режиму з використанням рухомої фази, що складалася з суміші деіонізованої води з фосфорною кислотою та ацетонітрилу.

Для забезпечення оптимальних умов розділення температуру колонки підтримували на рівні 60 °С [16].



Рис. 9.1. Рідинний хроматограф ChroZen HPLC [64]

9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Як основне джерело вуглецю використовувався кукурудзяний крохмаль, а основне джерело азоту - пептон

Визначення джерела вуглецю

Для визначення концентрації вуглецю використовується метод динітросаліцилової кислот.

Принцип даного методу полягає у виявленні вільної карбоксильної групи редукуючих цукрів при розпаді джерел вуглецю на моносахариди.

Спочатку окиснення кетонів і альдегідів кетонної та альдегідної функціональної групи фруктози та глюкози, відповідно, 3, 5-динітросаліциловою кислотою (жовтого кольору) до 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти (оранжево-червоного кольору) у лужному середовищі.

Необхідні матеріали та реактиви:

3,5-динітросаліцилова кислота

HCl

Спектрофотокolorиметр

Умови для проведення дослідів:

Відділяли суху біомасу за допомогою фільтрації з використанням фільтру з розміром пор 0,22 мкм, у фільтраті джерела вуглецю гідролізували за допомогою 7,5М HCl при 100 °C до моносахаридів та додавали 1 мл 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти. Відновлювальний цукор, що вивільнився, реагує з кислотою і відновлює його, внаслідок чого колір змінюється з жовтого на помаранчевий. Кількість відновлювального цукру, що виділилося в реакційній суміші, зчитують при 540 нм. Потім порівнюють зі стандартним калібрувальним графіком для редуруючих цукрів[65].

Визначення джерела азоту

Так як джерело азоту в пептоні використовується аміний азот, при визначенні концентрації визначають його.

Для визначення концентрації амінного азоту використовують метод формольного титрування.

Суть цього методу полягає у використанні хімічної реакції, за якої формальдегід взаємодіє з вільними аміногрупами амінокислот або інших органічних сполук. У результаті цієї взаємодії утворюються стабільні метиленові похідні, при цьому аміногрупи втрачають свої властивості основ. Завдяки цьому стає можливим кількісне визначення вільних карбоксильних груп, які залишаються активними — їх нейтралізують за допомогою титрування розчином лугу, наприклад, гідроксидом натрію. Цей підхід широко застосовують для аналізу білкових або аміновмісних речовин.

Необхідні матеріали та реактиви:

Бюретка для титрування

Піпетка

Колба

Пептон

Фенолфталеїн 0,1%

NaOH, натрій гідроксид, розчин, 0,1 н.

Формольна суміш(6 мл 20%-го розчину формальдегіду, 2-3 краплин фенолфталеїну і 2-3 краплини 0,1 н. розчин гідроксиду натрію .)

Умови для проведення досліду:

Культуральну рідину об'ємом 100 мл відфільтровують за допомогою фільтру з розміром пор 0,22 мкм та відбирають супернатантну рідину. Вміст амінного азоту визначають методом формольного титрування

У дві окремі колби вносять відповідно дослідний супернатант та 40 мл дистильованої води (контроль). До кожної додають фенолфталеїн і титрують розчином гідроксиду натрію до появи слабкого рожевого відтінку. Після цього в обидві колби вводять по 10 мл формольної суміші та проводять подальше титрування розчином гідроксиду натрію до досягнення однакового рожевого забарвлення в обох зразках. Концентрацію аміногруп у мг/мл обчислюють за відповідною формулою.

$$C = (A-B)fQ/V,$$

де А і В – об'єми розчину гідроксиду натрію, витрачені на титрування проби і контролю (мл); f - коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину гідроксиду натрію(0,97); Q - маса наявних амінокислот у пептоні, еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину гідроксиду натрію(0,7 мг); V – об'єм розчину пептону взятого для аналізу[20, 36].

Карта контрольних точок виробництва такролімусу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт ДР 1.1 Забір атмосферного повітря	Атмосферне повітря Висота забору	-	При установці труби	H = 10 м
Кт ДР 1.2 Очищення повітря через фільтр грубої очистки	Повітря на виході з фільтру грубого очищення Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 80%, тиск згідно паспорту
Кт ДР 1.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря Температура, тиск	Термометр технічний, манометр технічний	Вимірюється після стиснення	t = 180 °C, P = 0,35 МПа
Кт ДР 1.4 Стабілізація термолабільних показників	Охолоджене повітря Температура повітря, частка вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження та видалення зайвої вологи	t = 20°C, w = 30-40%
Кт ДР 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря Температура повітря	Термометр технічний	Після нагрівання	t = 50°C,
Кт, Км ДР 1.6 Очищення повітря на тонкому фільтрі	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 95-97%

Кт, Км ДР 1.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 99,99%
Кт, Км ДР 2.1 Приготування та стерилізація 6-% гідроген хлориду	Температура, час Розчин гідроген хлориду	Годинник, Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після приготування	C= 6% t= 30 хв
Кт, Км ДР 2.2 Приготування та стерилізація 6-% розчину натрій гідроксиду	Температура, час, стерильність Розчин натрій гідроксиду	Годинник, Термометр технічний, Мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після приготування	C=6% t = 112°C, □ t= 30 хв
Кт, Км ДР 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1, 3.4.1 Приготування, заварювання та стерилізація композиції А	Композиція А Температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 50-60°C, t = 112°C, □ t= 30 хв, P=0,05 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°C, □ t= 40 хв, P=0,05 МПа відсутність мікробіоти

<p>Кт, Км ДР 3.1.3, 3.2.3, 3.3.3, 3.4. 3 Приготування та стерилізація композиції В</p>	<p>Композиція В Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр технічний, годинник, манометр мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131°C, □ τ= 50 хв, P=0,05 МПа відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км ДР 3.1.4, 3.2.4, 3.3.4, 3.4. 4 Приготування та стерилізація композиції В</p>	<p>Композиція Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр технічний, годинник, манометр мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131°C, □ τ= 50 хв, P=0,05 МПа відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км ТП 4.1 Підтримання колекційної культури</p>	<p>Колекційна культура <i>Streptomyces tsukubensis</i> FIM-16-06 Тривалість культивування Температура Мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник Мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно</p>	<p>t = 2-4°C T= 3-4 міс. відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км ТП 4.2, 4.3 Одержання культури та вирощування на агаризованому середовищі колекційної культури</p>	<p>Робоча культура <i>Streptomyces tsukubensis</i> FIM-16-06 Температура, Час, морфологічна однорідність, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, мікробіологічний контроль, годинник</p>	<p>Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль після активації</p>	<p>t = 28-30°C, T= 48 год відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота</p>

<p>Кт, Км ТП 4.4 Вирощування культури в колбах на качалці</p>	<p>Посівний матеріал тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 6 годин</p>	<p>t = 28-30°C, T= 48 год W= 250 об/хв відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота</p>
<p>Кт, Кх, Км ТП 4.5 Вирощування культури в інокуляторі, об'ємом 10л</p>	<p>Посівний матеріал тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН середовища, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, датчик рН, оксиметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, аерація і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 6 години</p>	<p>t = 28-30°C, T= 48 год W= 250 об/хв рН= 7,5 Q= 1 л/л відсутність сторонньої мікробіоти,</p>

<p>Кт, Кх, Км ТП 4.6 Вирощування культури в посівному апараті 100 л</p>	<p>Посівний матеріал тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН середовища, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, датчик рН, оксиметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, аерація і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 8 години</p>	<p>t = 28-30°C, T= 72 год W= 250 об/хв рН= 7,5 Q= 1 л/л відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота</p>
<p>Кт, Кх, Км ТП 5 Виробничий біосинтез</p>	<p>Культуральна рідина тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація клітин <i>Streptomyces tsukubensis</i> FIM-16-06, концентрація продукту</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр технічний, тахометр технічний, Оксиметр мікробіологічний контроль, рідинний хроматограф</p>	<p>Температура, рН, аерація і перемішування контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікробіологічний контроль кожні 8 години, концентрація такролімусу визначається методом ВЕРХ</p>	<p>t = 28-30°C, T= 168 год W= 250 об/хв рН= 7,5 Q= 1 л/л C=1,522 мг/л відсутність сторонньої мікробіоти</p>

ЛІТЕРАТУРА

1. Umar, B. U., Rahman, S., Dutta, S., Islam, T., Nusrat, N., Chowdhury, K., ... & Haque, M. (2022). Management of atopic dermatitis: the role of tacrolimus. *Cureus*, 14(8). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9387362/#REF99>
2. Ткачова, О. В., Ногачевська, Г. В., Ткачева, О. В., & Ногачевская, Г. В. (2019). Імуносупресивні засоби: дослідження асортименту та обсягів споживання в Україні. [Електронний ресурс] Режим доступу: [8_Tkachova.pdf \(chmnu.edu.ua\)](https://chmnu.edu.ua/8_Tkachova.pdf)
3. Hussain, Y., & Khan, H. (2022). Immunosuppressive drugs. *Encyclopedia of infection and immunity*, 726. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8987166/>
4. Lee, H., Myoung, H., & Kim, S. M. (2023). Review of two immunosuppressants: tacrolimus and cyclosporine. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 49(6), 311. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10761313/>
5. Azarfar, A., Ravanshad, Y., Mehrad-Majd, H., Esmaeeli, M., Aval, S. B., Emadzadeh, M., ... & Khazaei, M. R. (2018). Comparison of tacrolimus and cyclosporine for immunosuppression after renal transplantation: An updated systematic review and meta-analysis. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation*, 29(6), 1376-1385. [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://journals.lww.com/sjkd/Fulltext/2018/29060/Comparison_of Tacrolimus and Cyclosporine for.16.aspx](https://journals.lww.com/sjkd/Fulltext/2018/29060/Comparison_of_Tacrolimus_and_Cyclosporine_for.16.aspx)
6. Лікі контроль. Інструкція ТАКРОЛІМУС [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[2598\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[2598])
7. Лікі контроль. Інструкція ЦИКЛОСПОРИН АЛДОКАЛОЇД [Електронний ресурс] Режим доступу:

[https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[8043\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[8043])

8. Tacrolimus. PubChem. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445643#section=Solubility>

9. Михальський, Л. (2004). Деякі сучасні напрями біотехнології у лекційному курсі для магістрів біології. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ekmair.ukma.edu.ua/server/api/core/bitstreams/42ecd3dc-3236-4105-b17c-9080b733bc62/content>

10. Hardinger, K., Magee, C. C., & Brennan, D. C. (2019). Pharmacology of cyclosporine and tacrolimus. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate Inc. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://medilib.ir/uptodate/show/7995>

11. Araya, A. A., & Tasnif, Y. (2019). Tacrolimus [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544318/>

12. Vanessa Ngan, Staff Writer, 2004. Updated: Dr Kelvin Truong, Dermatology Research Fellow, Westmead Hospital, Sydney, Australia; Dr Martin Keefe, Dermatologist, Christchurch, New Zealand. Copy edited by Gus Mitchell. (2021). Tacrolimus. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dermnetnz.org/topics/tacrolimus>

13. Lettner, A., & Herdegen, T. (2003). FK506 and its analogs-therapeutic potential for neurological disorders. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 2(3), 153-162. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12769796/>

14. Ordóñez-Robles, M., Santos-Beneit, F., & Martín, J. F. (2018). Unraveling nutritional regulation of tacrolimus biosynthesis in *Streptomyces tsukubaensis* through omic approaches. *Antibiotics*, 7(2), 39. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.mdpi.com/2079-6382/7/2/39>

15. Muramatsu, H., & Nagai, K. (2013). *Streptomyces tsukubensis* sp. nov., a producer of the immunosuppressant tacrolimus. *The Journal of Antibiotics*, 66(4), 251–254. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.nature.com/articles/ja2012116>

16. Yang, H., Qiu, G., Wang, D., & Lian, Y. (2021). Improvement of tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* by mutagenesis and optimization of fermentation medium using Plackett–Burman design combined with response surface methodology. *Biotechnology Letters*, 43(9), 1765-1778

[Електронний ресурс] Режим доступу: [Improvement of tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* by mutagenesis and optimization of fermentation medium using Plackett–Burman design combined with response surface methodology | *Biotechnology Letters* \(springer.com\)](#)

17. Singh, B. P., Kumar, P., Haque, S., Jawed, A., & Dubey, K. K. (2017). Improving production of tacrolimus in *Streptomyces tacrolimicus* (ATCC 55098) through development of novel mutant by dual mutagenesis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60. [Електронний ресурс] Режим доступу: [SciELO - Brazil - Improving Production of Tacrolimus In *Streptomyces Tacrolimicus* \(ATCC 55098\) Through Development of Novel Mutant by Dual Mutagenesis Improving Production of Tacrolimus In *Streptomyces Tacrolimicus* \(ATCC 55098\) Through Development of Novel Mutant by Dual Mutagenesis](#)

18. Kim, H. S., & Park, Y. I. (2007). Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(10), 1638-1644. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://koreascience.kr/article/JAKO200709906363973.pdf>

19. Li, Y., Liang, S., Wang, J., Ma, D., & Wen, J. (2019). Enhancing the production of tacrolimus by engineering target genes identified in important primary and secondary metabolic pathways and feeding exogenous precursors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 1081-1098. [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.researchgate.net/publication/331842435 Enhancing the production of tacrolimus by engineering target genes identified in important primary and secondary metabolic pathways and feeding exogenous precursors](https://www.researchgate.net/publication/331842435)

20. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ.

«бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

21. Martínez-Castro, M., Salehi-Najafabadi, Z., Romero, F., Pérez-Sanchiz, R., Fernández-Chimeno, R. I., Martín, J. F., & Barreiro, C. (2013). Taxonomy and chemically semi-defined media for the analysis of the tacrolimus producer 'Streptomyces tsukubaensis'. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 2139-2152.

[Електронний ресурс] Режим доступу:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22990582/>

22. Reimer, L. C., Sardà Carbasse, J., Koblitz, J., Ebeling, C., Podstawka, A., & Overmann, J. (2022). Bac Dive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D741-D746. [Електронний ресурс] Режим доступу:<https://bacdive.dsmz.de/strain/23304>

23. З початку року в Україні проведено понад 205 трансплантацій” 30.05.2023 Міністерство охорони здоров'я України[Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kmu.gov.ua/news/z-pochatku-roku-v-ukraini-provedeno-ponad-205-transplantatsii>

24. Autoimmune disorders found to affect around one in ten people. Universiti of OXFORD. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ox.ac.uk/news/2023-05-06-autoimmune-disorders-found-affect-around-one-ten-people>

25. Євтушенко, Є. В., Літус, В. І., Літус, О. І., & Коваленко, О. Є. (2023). ATOPIC DERMATITIS: CURRENT STATE OF THE PROBLEM IN UKRAINE AND THE WORLD. *Клінічна та профілактична медицина*, (5), 100–109. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://ir.nuozu.edu.ua:8080/handle/lib/4732>

26. “В Україні проживають понад 36 мільйонів людей – ООН” 20.04.2023 – УКРІНФОРМ. [Електронний ресурс] Режим доступу:<https://www.ukrinform.ua/rubric-society/3698384-v-ukraini-prozivaut-ponad-36-miljoniv-ludej-oon.html>

27. Helsi – протопик мазь 0,03% туба 10г [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://helsi.me/liki/kyiv/protopic/108308/overview>

28. Державний реєстр лікарських засобів України – такролімус: [Електронний ресурс] Режим доступу:

<http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%F2%E0%EA%F0%EE%EB%B3%EC%F3%F1>

29. Державний експертний центр МОЗ України – такролімус: Лист 1 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dec.gov.ua/?ZG93bmXvYWQ=L3dwLWNvbnRlbnQvdXBsb2Fkcy9mYXJtYWVtbnFnbHlhZC9jaGFuZ2VzLzIwMTQvcDI0Lnhscw==>

30. КАРЛАШ Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо–професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук – К: НУХТ, 2019. – 252 с.

31. Chen, D., Zhang, Q., Zhang, Q., Cen, P., Xu, Z., & Liu, W. (2012). Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Applied and environmental microbiology*, 78(15), 5093-5103. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416438/>

32. ВОС Science: Tacrolimus monohydrate [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.bocsci.com/product/tacrolimus-monohydrate-cas-109581-93-3-54252.html>

33. KEGG— Кіотська енциклопедія генів і геномів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/stsu00500>

34. KEGG— Кіотська енциклопедія генів і геномів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/stsu00010>

35. KEGG— Кіотська енциклопедія генів і геномів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/stsu00280>

36. KEGG— Кіотська енциклопедія генів і геномів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/stsu00400>

37. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до проведення практ. занять для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання./ уклад. Ю.М. Пенчук - К. : НУХТ, 2021. - 14 с.

38. Ledum – Ламінарна шафа біологічної безпеки HR1200–IIA2 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ledum.com.ua/486>

39. Entech–ukraine – Повітрозбірник, ресивер для стисненого повітря – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p522181531-vozduhosbornik-resiver-dlya.html>

40. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв[Електронний ресурс]: Навч. посібник. – К.:НУХТ, 2022. – 377с

41. ГрегірчакН.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.

42. Засіб дезінфікуючий «Дезосепт Форте» Дезо. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezo.com.ua/shop/zasib-dezinfikuyuchij-dezosept-forte-22-kg>

43. Інструклін Нью. Хлорка. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p2512257994-instruklin-nyu-1000.html?srsId=AfmBOooklLiJlvhLHI7_Fs5IYZjsIPE4uWu2RpmBhFBCgFzXbqGlosHG

44. Засіб дезінфікуючий «Бактодез (Bactodez). Лізоформ [Електронний ресурс] Режим доступу: [.https://lysoform.in.ua/zasib-dezinfikuiuchy-baktodez-bactodez1000-ml/](https://lysoform.in.ua/zasib-dezinfikuiuchy-baktodez-bactodez1000-ml/)

45. Засіб дезінфікуючий "Мікрасепт (Micrasept)" з дозуючим пристроєм. Лізоформ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://lysoform.in.ua/zasib-dezinfikuiuchy-mikrasept-micrasept-z-dozuiuchym-prystroiem-1000-ml/>

46. *Державний реєстр дезінфекційних засобів*. Дія. [Електронний ресурс]
Режим доступу: https://data.gov.ua/dataset/reestr_dezzasobiv_moz
47. Повітрозабірник великий з дефлектором, одинарний. DEYARDA.
[Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://deyarda.com.ua/povitrozabirnyk-velykyi-z-deflektorom-odynarnyi/>
48. Кишеньковий фільтр грубого очищення G3-G4. АйсКлімат.
[Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.iceclimate.com.ua/shop/kupyty-kondycioner-v-kyevi/komplektuyuchi-do-kondycioneriv/g3-g4/>
49. Компресор гвинтовий промисловий стаціонарний Mast LZN-20 COMBO inverter "VELESTOOL" [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://velestool.com.ua/ua/p2126199030-vintovoj-kompressor-mast.html>
50. Пластинчастий теплообмінник THERMAKS РТА (GC)-51 opeks.ua.
[Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://opeks.ua/ua/plastinchastij-teploobminnik-thermaks-rta-gc-51/?utm_source=google&device=c&keyword=&utm_medium=x&utm_campaign=SPM_OpU0924&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwsc24BhDPARIsAFXqAB2iaVOu_0wvx7YiqZYu7QvSEne9c-5bt4GhPdBMYRzMYttBSLfVeygaAlkmEALw_wcB
51. Customized Industrial Bag Pocket Medium Efficiency Air Filters - F5, F6, F7, F9 for HVAC and Cleaning Room. Healthy Filters [Електронний ресурс]. – Режим доступу:
<https://www.airhfilters.com/uk/customized-industrial-bag-pocket-medium-efficiency-air-filter-f5-f9-for-hvac-cleaning-room>
52. Single Flange Filter Manufacturers and Suppliers SAF-airfilters [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.saf-airfilters.com/hepa-filter/deep-pleat-hepa-filter/single-flange-hepa-ilter.html>
53. Мембранний насос дозатор. VIKAQUA. [Електронний ресурс]
Режим доступу: <https://www.vicaqua.com.ua/news/?sid=190/>
54. Ваговий дозатор для рідких продуктів FLEX W40. ФлексМаш.
[Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://flexmash.com/equipment/dozuyuche->

obladnannya/flex-w40/

55. JSR-B Jacketed Stainless Steel Reactor. Lab1st. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.lab1st.com/product/jacketed-stainless-steel-reactor-jsr-b>

56. AL-100: Benchtop Air Lift BioReactor. BioReactor Sciences. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.bioreactorsciences.com/al100-benchtop-air-lift-bioreactor>

57. Збірник С-50. Промвіт. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/zbirnik-s-50-gmp/>

58. AL-200: Air Lift Pilot Scale to Industrial Scale BioReactor – BioReactor Sciences. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.bioreactorsciences.com/al200-air-lift-pilot-scale-to-industrial-scale-bioreactor>

59. Збірник СМ-350 мобільний. Промвіт. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/zbirnik-sm-350-mobilnij/>

60. Chemical Mixing Equipment Liquid Reactor Stainless Steel Mixing Tank with Magnetic Agitator. Made-in-China. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://linbel.en.made-in-china.com/product/YnRpUPITmmcw/China-Chemical-Mixing-Equipment-Liquid-Reactor-Stainless-Steel-Mixing-Tank-with-Magnetic-Agitator.html>

61. Airlift Bioreactors. Lab1st-Scientific. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.lab1st.com/airlift-bioreactors>

62. Yang, H. J., Zhang, Z. L., Yan, L. B., Chen, Z. Q., Ju Lin, X., Cheng, X., ... & Lian, Y. Y. (2022). Modification of nanoscale polymeric adsorbent for the preparative separation and purification of tacrolimus from fermentation broth of *Streptomyces tsukubaensis*. *Journal of Chromatography A*, 1675, 463180. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967322003739>

63. Zhang, S., Zhao, J., Kong, M., Li, J., Li, M., Ma, M., ... & Chen, M. (2024). Crystallization Kinetics of Tacrolimus Monohydrate in an Ethanol–Water System. *Crystals* (2073-4352), 14(10). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.mdpi.com/2073-4352/14/10/849>

64. YounginChromass [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://eng.younginm.com/goods/read.php?M2_IDX=18457&SC_ALL=&SC_SC1_IDX=400&SC_SC2_IDX=&SC_SF_IDX=Array&SC_SM_IDX=&SC_TYPE=&SC_WORD=&SC_TI_IDXS=&SC_PA_LEN=&SC_LIST_TYPE=&SC_BOOKMARK=N&SP_CODE=2112G4I7

65. Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Basic techniques in biochemistry, microbiology and molecular biology (pp. 9-10). New York, NY, USA.: Springer. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-9861-6>

Kim, H. S., & Park, Y. I. (2007). Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(10), 1638-1644

J. Microbiol. Biotechnol. (2007), 17(10), 1638-1644



Lipase Activity and Tacrolimus Production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 Mutant Strains

KIM, HYUNG SOO AND YOUNG IN PARK*

Department of Biotechnology, School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Korea

Received: April 3, 2007

Accepted: June 13, 2007

Abstract The effect of carbon sources on tacrolimus production by a mutant strain of *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119, an isolate from soil, was examined. Among the carbohydrates and oils tested in this work, a mixed carbon source of soluble starch and corn oil was the best. An analysis of the culture kinetics also showed that, in contrast to the carbohydrates, the corn oil was consumed later in the antibiotic production phase, implying that the oil substrate was the principal carbon source for the biosynthesis of tacrolimus, and this was directly proven by experiments using ¹⁴C-glucose and ¹⁴C-labeled substrates. Furthermore, corn oil induced the formation of lipase by the mutant strain, whereas the addition of glucose significantly repressed lipase activity. The lipase activity exhibited by the FK-506-overproducing mutants was also observed to be directly proportional to their tacrolimus yield, indicating that a high lipase activity is itself a crucial factor for tacrolimus production. A feasibility study with a 2004 pilot-scale fermenter and the best strain (FK-XII-15372) identified in this work revealed a high volumetric and specific productivity of about 495 mg/l and 0.34 mg/mg dry mycelium, respectively.

Keywords: Tacrolimus, lipase activity, *Streptomyces clavuligerus*

Tacrolimus (FK-506), an antibiotic with immunosuppressant activity, was first discovered in 1984 from the fermentation broth of *Streptomyces tsukubaensis* N09993 (soil sample, Takahashi, Japan) by Fujisawa scientists [9]. Their subsequent characterization and *in vitro* and *in vivo* immunopharmacological tests of the novel immunosuppressive agent, and the extensive clinical trials initiated in 1989 at the University of Pittsburgh, revealed that the neutral macrocyclic antibiotic had a superior potency relative to cyclosporin A as regards the prevention of graft rejection and treatment of autoimmune diseases, plus fewer side effects [7, 23]. Thus, because of the clinical importance described

above, many attempts have been made to develop a more efficient and economical process for the industrial production of FK-506. These include studies on screening for new FK-506-overproducing strains, strain improvement based on classical and genetical manipulations, and optimization of the medium composition and culture conditions [6, 13, 24]. In a recent report by the current authors, a novel FK-506-overproducing strain of *Actinosynnema* was isolated from a soil sample taken from Chungnam province, and the isolate identified as a strain of *Streptomyces clavuligerus* and named *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119.

Similar to many other antibiotic fermentations, the isolate was found to attain the highest FK-506 titer when cultured in a complex medium containing both soluble starch and corn oil as the carbon source. Lipase is responsible for the breakdown of triacyl glycerols, the main constituent of oils, and may also play a role in the import of fatty acids into cells [4, 5, 11]. As such, the enzyme is a prerequisite for the utilization of an oil-supplemented substrate. Of note, the fatty acids thus transported into cells are known to be broken down via the β -oxidation pathway to produce acetyl (or propionyl) coenzyme A, which are reported to be the precursors for the biosynthesis of polyketide antibiotics [12, 22]. As expected, *S. clavuligerus* CKD 1119 was also observed to produce a cell-associated form of lipase, like various other *Streptomyces* species [25, 26].

Accordingly, this study attempted to demonstrate whether the same situation mentioned above was also true for tacrolimus biosynthesis by *S. clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. In addition, the detailed link between the lipase activity and the specific productivity of FK-506 in the mutants was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

FK-506-overproducing mutant strains of *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 previously isolated from soil by the current authors were used throughout this study. Stock

cultures of these strains were maintained at 4°C on a YM medium (4 g/l soluble starch, 10 g/l malt extract, 4 g/l yeast extract, 0.05 g/l tacrolimus, 20 g/l agar).

Media and Cultural Conditions

To obtain seed cultures of the *S. clavuligerus* CKD 1119 mutant strains, 0.2 ml of frozen mycelia (about 10⁷ spores/ml) was thawed and transferred into a 500-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of a seed medium and incubated at 28°C for 2 days on a reciprocal shaker at 220 rpm. The seed medium consisted of 20 g/l soluble starch, 10 g/l cotton seed meal, 10 g/l corn steep liquor, 10 g/l dried yeast, 2 g/l CaCO₃, and 1 g/l SAG-471, and was adjusted to pH 7.0 after autoclaving. Batch cultures were then grown in a 100-ml Erlenmeyer flask containing 20 ml of a production medium at 25°C for 8 days on a reciprocal shaker at 220 rpm, or in a 7-l jar fermenter (KF-7, KoBio Tech, Korea) containing 4.5 l of the production medium, consisting of 50 g/l soluble starch, 5 g/l corn steep powder, 30 g/l cotton seed meal, 30 g/l corn oil, 2 g/l malonic acid, 0.5 g/l methionine, 0.3% (v/v) ethanol, 0.1 g/l FeSO₄·7H₂O, 7 g/l CaCO₃, 0.2 g/l NaH₂PO₄, and 1 g/l SAG-471.

Cell Growth Measurement

The cell growth was followed by determining the mycelial dry weight. The mycelium was separated from the culture broth (20 ml) by centrifugation at 9,600 ×g for 20 min, and then the resulting pellet was washed twice with *n*-butanol-ethanol (1:1, v/v) (10 ml) and once with water (10 ml), and dried to a constant weight at 80°C. The viscosity was determined using a Brookfield Viscometer (Loughdon, U.K.) at 20 rpm and room temperature.

Quantitative Analysis of Carbon Sources

The culture broth was centrifuged at 9,600 ×g (Vision Scientific Co. Ltd, model VSS500 CF) for 20 min and 1 ml of the supernatant transferred to a 50-ml volumetric flask. After adding 5 ml of 1.5 N HCl, each sample was boiled for 2 h, and then 5 ml of 1 N NaOH was added and the volume adjusted to 50 ml using a phosphate buffer (pH 8.0; 12.8 g/l KOH and 27.2 g/l KH₂PO₄). After filtering, the concentration of sugar was measured using a sugar analyzer (YSI model 2700, U.S.A.).

Oil Measurement

The residual oil concentrations in the culture broth were assayed using a modified version of the procedure developed by Omura *et al.* [20]. Two ml of the culture broth was added to a 1% Adecato solution in a 50-ml mess flask, and then centrifuged after shaking for 10 min (sample solution [SA]). Reaction mixture 1 (RM-1) contained a 0.2 M K-Na phosphate buffer (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10% Triton X-100, 0.1 M ATP (pH 7.5), 10 mM CoA (pH 7.5), and 50 μ M acyl-CoA synthetase; RM-2 contained a 0.2 M

K-Na phosphate buffer (pH 7.5), 0.3% 4-aminopyridine, 0.2% phenol, 5.0% NaN₃, 0.25% *N*-ethylmaleimide, 100 μ M peroxidase, and 20 μ M acyl-CoA oxidase; RM-3 contained a 0.2 M K-Na phosphate buffer (pH 7.5) and 800 μ M lipase; and the standard solution (ST) used was 0.1% oleic acid. RM-3 was preincubated for 3 min at 37°C and the reaction initiated by the addition of an SA, or distilled water for a blank reaction (BR). After 10 min, RM-1 was added to the SA and BR, plus 0.2% Triton X-100 was added to the ST, and then the reaction mixtures were incubated for a further 10 min. Thereafter, RM-2 was added and the incubation continued for another 10 min, at which point, the OD was measured with a UV spectrophotometer (HP 8453, 500 nm) and the quantity of oil calculated using the following equation:

$$\frac{(SA - BR)}{(ST - BR)} \times \text{dilution rate (g/l)}$$

Enzyme Activity Detection and Activity Assay

The lipase activity was determined at 30°C using a Metrohm pH-stat system. The substrate was composed of 15 ml of tributyrin glycerol and 50 ml of an emulsifier agent (17.9 g NaCl, 0.41 g KH₂PO₄, 540 ml glycerol, 6 g arabic gum, and distilled water) in a final volume of 1 l [17]. The emulsion was mechanically stirred and the free fatty acids released were titrated by the addition of 50 mM sodium hydroxide to maintain a constant pH at an end-point value of 7.0. One unit of lipase activity corresponded to the amount of enzyme that catalyzed the hydrolysis of 1 μ M tributyrin glycerol/min [10]. To investigate the location of the lipase activity in the cells, the lipase activity was measured in the whole broth, supernatant, and pellet samples, plus whole broth that had been subjected to sonication using a Soniprep 150 (Sanyo) at an 8- μ m setting for 2-10 min [16].

Selection of Mutants with Enhanced Lipase Activity

The *S. clavuligerus* Te-X-12303 strain, a drug-resistant mutant with enhanced tacrolimus productivity isolated in this work, was used as the starting strain for the isolation of modified strains capable of producing higher levels of lipase activity. The mutants were obtained by inoculating the starting strain after mutagenesis by UV irradiation onto selective plates containing 1.0 g/l Tween 80, 0.5 g/l CaCl₂, and 0.01 g/l methyl red as the indicator. After 72 h of incubation, the diameters of the halo zones surrounding the colonies were measured, and the colony that formed the largest clear zone was selected.

Assay of ¹⁴C-labeled Tacrolimus

Cells of the tacrolimus-overproducing strain grown in the production medium for 72 h were aseptically collected and washed with distilled water and suspended in sodium phosphate (pH 7.0) to make a 150-ml cell suspension.

Yan, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Yang, H., Qiu, G., Wang, D., & Lian, Y. (2021). Improvement of tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* by mutagenesis and optimization of fermentation medium using Plackett–Burman design combined with response surface methodology. *Biotechnology Letters*, 43(9), 1765-1778



Improvement of tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* by mutagenesis and optimization of fermentation medium using Plackett–Burman design combined with response surface methodology

Lingbin Yan¹ · Zhulan Zhang · Yin Zhang · Huangjian Yang · Guanrong Qiu · Desen Wang · Yunyang Lian

Received: 7 June 2020 / Accepted: 30 April 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract
Objective This study was conducted to enhance the production of tacrolimus in *Streptomyces tsukubaensis* by strain mutagenesis and optimization of the fermentation medium.
Results A high tacrolimus producing strain *S. tsukubaensis* FIM-16-06 was obtained by ultraviolet mutagenesis coupled with atmospheric and room temperature plasma mutagenesis. Then, nine variables were screened using Plackett–Burman experimental design, in which soluble starch, peptone and Tween 80 showed significantly affected tacrolimus production. Further studies were carried out employing central composite design to elucidate the mutual interaction between the variables and to work out optimal fermentation medium composition for tacrolimus production. The optimum fermentation medium was found to contain 61.61 g/L of soluble starch, 20.61 g/L of peptone and 30.79 g/L of Tween 80. In the optimized medium, the production of tacrolimus reached 1293 mg/L in shake-flask culture, and reached 1522 mg/L while the scaled-up fermentation

was conducted in a 1000 L fermenter, which was about 3.7 times higher than that in the original medium.
Conclusions Combining compound mutation with rational medium optimization is an effective approach for improving tacrolimus production, and the optimized fermentation medium could be efficiently used for industrial production.

Keywords Central composite design · Fermentation medium · Plackett–Burman design · Tacrolimus · Tween 80

Introduction

Tacrolimus (also referred to FK506), a 23-membered polyketide macrolide antibiotic, is produced by various *Streptomyces* species. (Barreiro and Martinez-Castro 2014; Kim and Park 2008). Due to the advantages of strong immunosuppressive activity and low incidence of acute rejection, tacrolimus has been widely used as an immunosuppressive agent for organ transplantation and autoimmune system (Allison 2000; Husain and Singh 2002; Barreiro and Martinez-Castro 2014). Since the discovery of tacrolimus in 1984 (Goto et al. 1987), considerable efforts have been carried out to improve tacrolimus yield of the producing strains. The random mutagenesis was used to screen the tacrolimus over-producing mutants (Kim and Park 2008; Jung et al. 2009). The fermentation

The fermentation medium composed of (g/L): 40 corn starch, 20 peptone, 20 glucose, 20 soybean meal, 0.025 CuSO₄, 0.25 MgSO₄, 1 NaCl, 3 CaCO₃, and pH was adjusted to 7.5. The 10% (v/v) mature seed culture was inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL medium. Cultivation was carried out at 28 °C and 250 rpm for 7 days.

Mutagenesis

For UV treatment, the mature spores of the original strain *S. tsukubaensis* FIM-07-23 was collected with sterile distilled water. The prepared spore suspension (OD₆₀₀ of 0.6 ~ 0.9) was exposed to 255 nm UV light at a distance of 20 cm for 75 s. The treated samples were diluted and spread on ISP4 agar, and then incubated for 10 days at 28 °C. Grown colonies were picked up for the further screening.

ARTP, which induces mutations at a higher rate than UV irradiation and chemical mutation, was proved to be an efficient tool to generate stable high-yield mutant strains for microorganism breeding. The mature spores were harvested from a fresh slant of the mutant, and re-suspended in sterile distilled water to reach OD₆₀₀ of 0.6 ~ 0.9. Next, 10 µL of the spore suspension was spread on steel plate and subjected to ARTP (Wuxi TMAXTREE Biotechnology Co., Ltd., China) irradiation for 90 s at radio-frequency power input of 120 W and helium gas flow of 10 L/min. The steel plates with treated spores were transferred into the centrifuge tubes containing 1 mL sterile distilled water. The treated spores were collected and spread on ISP4 plate containing 25 mg/L streptomycin. Mutant colonies were randomly picked up and inoculated into the fermentation medium in shaking flasks for evaluation of tacrolimus production.

Analytical methods

Tacrolimus was quantitated by the following the process: The culture broth was diluted with two volumes of ethanol, and subjected to ultrasonication (50 Hz) for 30 min and then centrifuged at 8228 × g for 5 min. The supernatant was filtered through 0.22 µm pore size filter and then analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC 1260 instrument, Agilent, USA) on an AkroNobel Kromasil 100-S-C18 column (5 µm, 4.6 × 250 mm) with monitoring at 215 nm. The mobile phase was

deionized water of 0.1% phosphoric acid with acetonitrile (33:67, v/v) at a flow rate of 1 mL/min and the column temperature was set at 60 °C.

The biomass of fermentation sample was reflected by packed mycelium volume (PMV). Briefly, 10 mL fermentation broth was centrifuged at 8228 × g for 10 min. PMV value was obtained by dividing the cell pellets volume to the broth volume.

DO (dissolved oxygen) was detected by METTLER TOLEDO InPro 6800 Series O₂ Sensors, and pH was measured using METTLER TOLEDO InPro 3030 pH Combination Electrode. Both were monitored and recorded online during the fermentation process.

Optimization experiments

Single factor test was adopted to determine the optimal concentration and time for Tween 80 addition. Plackett–Burman design was used to screen for key variables of tacrolimus production, and then the steepest ascent experiment was performed to approach the optimum level of selected variables. Subsequently, the selected variables were subjected to central composite design to determine the optimum values. Finally, experiments were carried out to verify the reliability of the experimental model. All the experiments were performed in triplicate, and the results were presented as the average values.

Addition of Tween 80

Different amounts of the Tween 80 were added to each 500 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL original medium to make a final Tween 80 concentrations of 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 g/L (w/v), respectively. 5 mL of seed culture was inoculated into each Erlenmeyer flasks and incubated at 28 °C, 250 rpm for 168 h in shaker incubator. Optimum Tween 80 concentration was defined by analysis of tacrolimus yields of culture broth with HPLC.

To study the impact of Tween 80 addition time on tacrolimus production, the optimal amount of Tween 80 was added to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL original medium at 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 and 168 h during the fermentation process, respectively. The suitable addition time of Tween 80 was defined by analysis tacrolimus yields of culture broth with HPLC.

L. Yan · Z. Zhang (✉) · Y. Zhang
H. Yang · G. Qiu · D. Wang · Y. Lian (✉)
Fujian Provincial Key Laboratory of Screening for Novel
Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology,
Fuzhou 350007, China
e-mail: jsoylian9963@sina.com
Y. Lian
e-mail: yyllianf@139.com

Published online: 22 May 2021



Singh, B. P., Kumar, P., Haque, S., Jawed, A., & Dubey, K. K. (2017). Improving production of tacrolimus in *Streptomyces tacrolimicus* (ATCC 55098) through development of novel mutant by dual mutagenesis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.

Biological and Applied Sciences

BRAZILIAN ARCHIVES OF
BIOLOGY AND TECHNOLOGY

AN INTERNATIONAL JOURNAL

Vol. 60, e17160366, January-December 2017
https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160366
ISSN 1678-4324 Online Edition

Improving Production of Tacrolimus In *Streptomyces Tacrolimicus* (ATCC 55098) Through Development of Novel Mutant by Dual Mutagenesis

Bhanu P Singh¹, Punit Kumar², Shafull Haque³, Arshad Jawed⁴, Kashyap Kumar Dubey^{5*}.
¹Centre for Biotechnology, M.D. University Rohtak-124001, Rohtak, Haryana, India; ²Microbial Process Development Laboratory, University Institute of Engineering & Technology, M.D. University Rohtak-124001, Haryana, Rohtak, India; ³Centre For Drug Research, Faculty of Pharmacy Vikki Biocentre PO Box 56 FJ-00014 University of Helsinki, Helsinki, Finland; ⁴Research & Scientific Studies Unit, College of Nursing and Allied Health Sciences, Jazan University, Jazan, Saudi Arabia; ⁵Department of Biotechnology, Central University of Haryana, Mahendragarh -123031, Haryana (India)

ABSTRACT

Tacrolimus is a polyketide macrolide produced by *Streptomyces* species which is widely used as anti-fibrotic agent and potent immunosuppressant. In this article dual mutagenesis approach using mutagens (NTG–EMS–UV) was used to develop a mutant strain of *Streptomyces tacrolimicus* (ATCC 55098) for higher tacrolimus production and this strain showed higher tacrolimus production at 82.5 mg/L. Interestingly, addition of L-lysine (0.2 g/L) into the production medium further enhanced the tacrolimus production to ~102 mg/L at 7-L-jed-batch bioreactor. To the best of our knowledge this is the first report mentioning efficient strain development for higher production of tacrolimus using dual mutagenesis. The obtained data presents an impressive model for higher production of tacrolimus and enhanced our understanding regarding improvement in production capacity of tacrolimus in *Streptomyces tacrolimicus*.

Key words: Immunosuppressant, Macrolide polyketide, Tacrolimus, Mutagenesis

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Bacterial Culture Conditions

All the chemicals used were of analytical grade. EMS, NTG, lactose, glucose, yeast extract, peptone, NaCl, FeSO₄, KNO₃, acetone, acetonitrile, CaCl₂ and MgSO₄ and agar-yeast purchased from Hi-Media (Mumbai) Sigma, RFLC (India), SD Fine Chemicals (Mumbai), India. Tacrolimus standard was purchased from Sigma. *S. tacrolimicus* ATCC 55098 (Ref. no. 20) was obtained from American Type Culture Collection Centre. The bacterial culture was maintained on slants and petri plates containing M1 medium enriched with 4 g/L glucose, 10 g/L malt extract, 2 g/L peptone and 17 g/L agar having pH 7.3, and finally incubated at 28°C.

Braz. Arch. Biol. Technol. v.60: e17160566, Jan/Dec 2017

Improving production of tacrolimus

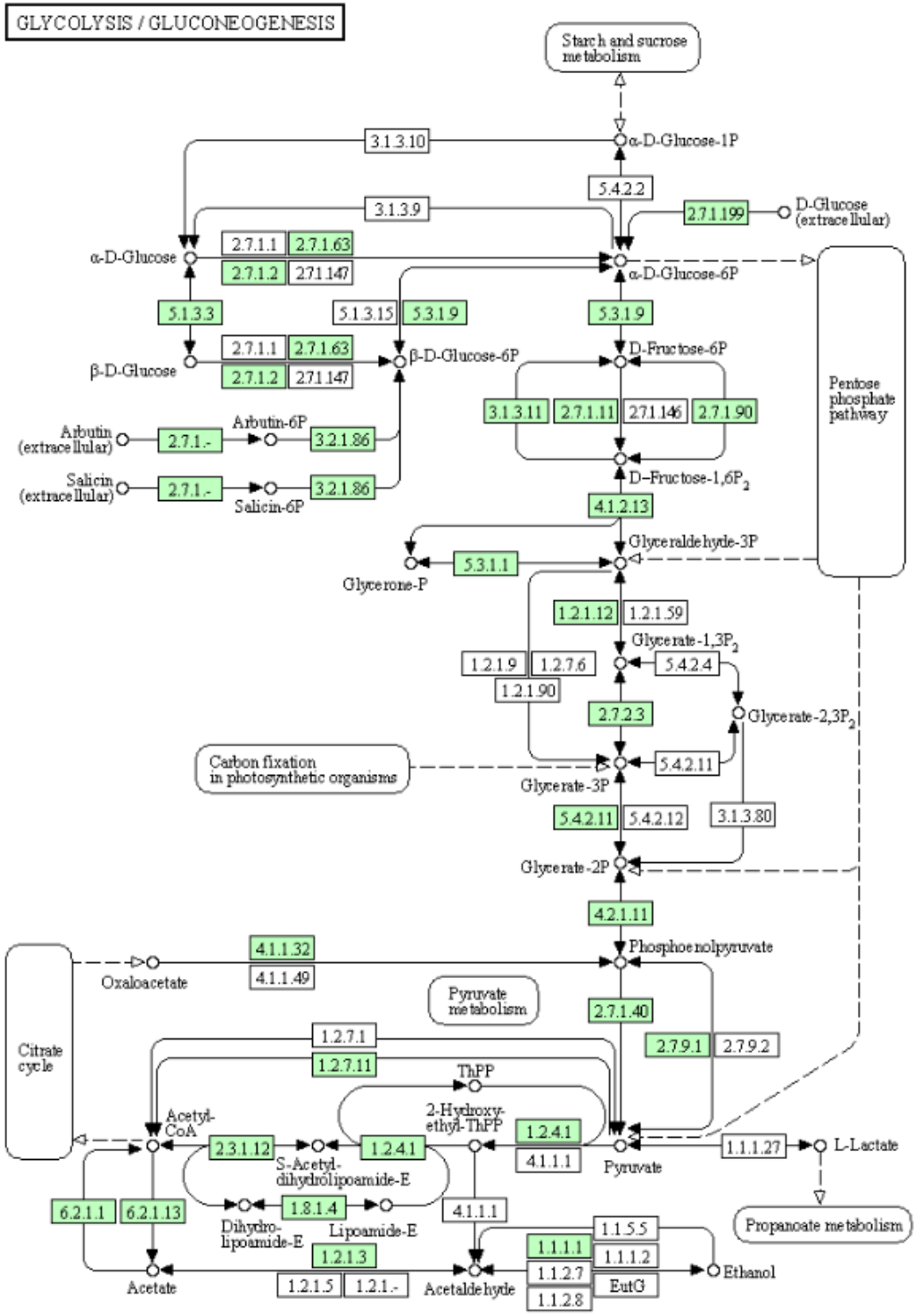
The 24 h old seed culture was used as inoculum, and 10% of medium volume was used as inoculum for inoculation of production medium having the composition of 35 g/L lactose, 11.25 g/L peptone, 0.477 g/L FeSO₄, 0.257 g/L MgSO₄, 10 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 1 g/L NaCl, 0.8 g/L CaCl₂ and 0.5 g/L KNO₃, and incubated at 28°C on a temperature controlled orbital shaker at 220 rpm for 120 h in a 500 mL Erlenmeyer baffled flask. Various amino acids used were filter-sterilized by membrane filter (0.22 µm, Millipore) and added after 28 h of inoculation.

Mutagenesis

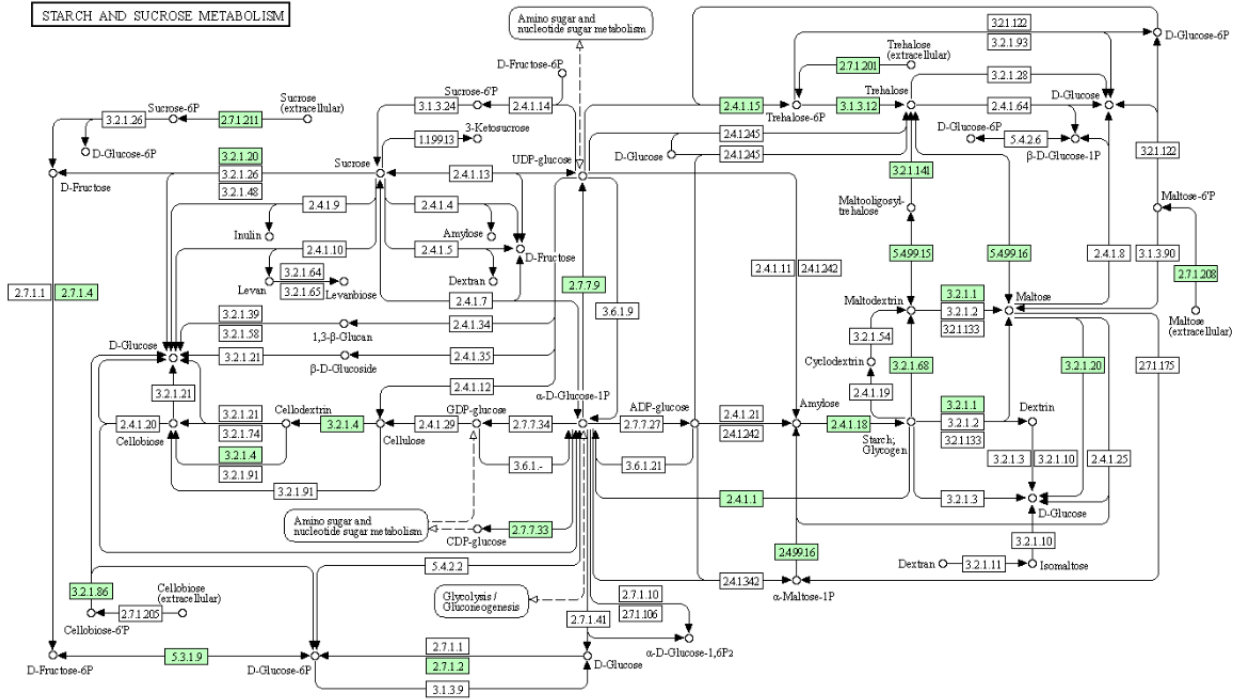
Stock solutions (10 mM each) of EMS and NTG were prepared in phosphate buffer (pH 9.0). Spores were separated by passing the broth of a known cfu/ml through sterile cotton packed in a sterile column. Spores of wild-type were suspended in phosphate buffer (pH 7.0) and divided into aliquots of 0.1 ml containing 5 × 10⁸ spores. EMS and NTG were added to the spore suspension at concentrations of 50 µM, 100 µM, 300 µM, 500 µM, 800 µM, and 1000 µM, and incubated for 15 min in shake flasks at 28°C. The mutagenesis was terminated by diluting the spore suspensions with 0.16 M sodium thiosulfate¹⁰⁰ and centrifuged at 3000 × g for 5 min. The residue containing spores were washed twice with phosphate buffer having pH 7.0. The process was repeated and applied for other samples of diluted spore suspensions and the respective spore suspensions (20 µl) were spread into Petri dishes containing culture medium containing 4 g/L glucose, 10 g/L malt extract, 2 g/L peptone, 2% agar at pH-7.3.

The bacteria were cultivated in shake flask culture medium containing 4 g/L glucose, 10 g/L malt extract, 2 g/L peptone having pH 7.3 at 28°C for 72 h. The bacterial culture was diluted till OD₆₀₀ reached to 0.1, and 0.1 mL of diluted culture was streaked on GMP agar plates containing culture medium of 4 g/L glucose, 10 g/L malt extract, 2 g/L peptone, 2% agar with pH 7.3. The bacterial culture plates were then

KEGG

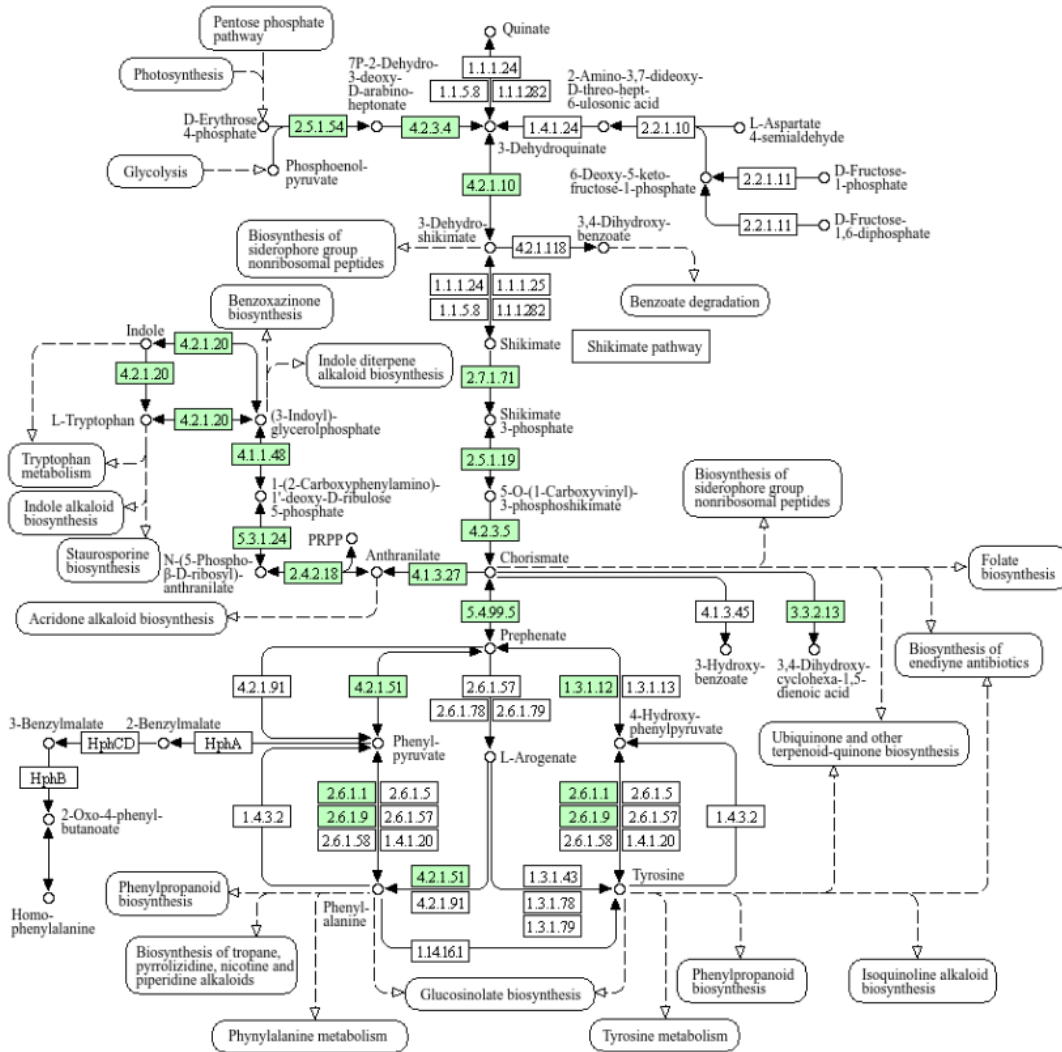


STARCH AND SUCROSE METABOLISM



00500 2/6/17
 (c) Kanehisa Laboratories

PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS



VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE DEGRADATION

