

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

«04» лютого 2026 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

«04» лютого 2026 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 тобраміцину *Streptomyces tenebrarius*

Виконав: здобувач V курсу, групи ЗБТ-5-1

ДАВИДЧУК Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ЛИЧ Інна Валентинівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент КАМЕНСЬКА М.В.
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2026 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 СТАБНИКОВ

“ 01 ” грудня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Давидчук Вікторія Олегівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез тобраміцину *Streptomyces tenebrarius*

керівник роботи доц., Лич Інна Валентинівна,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28.11.2025 року № 957-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 30.01.2026

3. Вихідні дані до роботи Цільовий продукт біосинтезу – тобраміцин.
Біологічний агент - *Streptomyces tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO,.
Об'єм ферментера для виробництва тобраміцину – 1 м³, коефіцієнт заповнення
складає - 0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика тобраміцину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору
біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4.
Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу тобраміцину. РОЗДІЛ 5.
Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу
тобраміцину *Streptomyces tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO. РОЗДІЛ 7.
Основні етапи виділення та очищення тобраміцину. РОЗДІЛ 8. Контроль
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу тобраміцину на 1 аркуші формату А1

Апаратурна схема біосинтезу тобраміцину на 2 аркушах формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика тобраміцину	01.12.2025 – 05.12.2025	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	06.12.2025 – 11.12.2025	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	12.12.2025 – 14.12.2025	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу тобраміцину	15.12.2025 – 18.12.2025	
5	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	19.12.2025 – 20.12.2025	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми біосинтезу тобраміцину <i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEr*-tobO	21.12.2025 – 23.12.2025	
7	РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення тобраміцину	24.12.2025 – 28.12.2025	
8	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	29.12.2025 – 30.12.2025	
9	Вступ, реферат, список використаної літератури	02.01.2026 – 03.01.2026	
10	Оформлення списку літературних джерел	04.01.2026 – 05.01.2026	
11	Оформлення вступу та реферату	06.01.2026 – 08.01.2026	
12	Оформлення презентації	09.01.2026 – 11.01.2026	
13	Оформлення пояснювальної записки	12.01.2026 – 15.01.2026	

Здобувач

(підпис)

Керівник роботи

(підпис)

Вікторія ДАВИДЧУК

(ім'я та прізвище)

Інна ЛИЧ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу тобраміцину з використанням актиноміцетів *Streptomyces tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR$ /ermEp*-tobO, які синтезують 4 г/л тобраміцину. Тобраміцин - аміноглікозидний антибіотик, який є одним із членів комплексу антибіотиків широкого спектру дії, який особливо ефективний в лікуванні муковісцидозу. Розрахована потужність виробництва становить 101 кг (6,3 м³ культуральної рідини) тобраміцину за рік.

Технологічна схема біосинтезу тобраміцину включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання тобраміцину передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, восьми розділів, списку використаних джерел, технологічної схеми (формат А2, 2 аркуші) та апаратурної схеми (формат А1, 2 аркуші). Загальний обсяг роботи – 75 сторінок, 12 таблиць.

Ключові слова: тобраміцин, антибіотики, муковісцидоз, резистентність, *Streptomyces tenebrarius*, біосинтез.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and instrumental schemes for the biosynthesis of tobramycin using actinomycetes *Streptomyces tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR$ /ermEp*-tobO, which synthesize 4 g/l of tobramycin. Tobramycin is an aminoglycoside antibiotic, which is one of the members of the complex of broad-spectrum antibiotics, which is especially effective in the treatment of cystic fibrosis. The calculated production capacity is 101 kg (6.3 m³ of culture fluid) of tobramycin per year.

The technological scheme for the biosynthesis of tobramycin includes auxiliary work (preparation of aeration air, preparation of titrating agents, sterilization of nutrient

media) and the technological process (four stages of growing seed material and biosynthesis in a fermenter with a volume of 1 m³ with a filling factor of 0.6). The technology for obtaining tobramycin involves the use of a single-stage cultivation scheme using a deep periodic method.

The qualification work consists of an introduction, eight chapters, a list of sources used, a technological scheme (format A2, 2 sheets) and an apparatus scheme (format A1, 2 sheets). The total volume of the work is 75 pages, 12 tables.

Keywords: tobramycin, antibiotics, cystic fibrosis, resistance, *Streptomyces tenebrarius*, biosynthesis.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТОБРАМІЦИНУ	10
1.1. Структурні особливості	10
1.2. Фізичні властивості	11
1.3. Антибактеріальна активність	11
1.4. Застосування тобраміцину	12
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму <i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO – продуцента тобраміцину.....	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	27
3.1. Потреба населення України в тобраміцині.....	27
3.2. Розрахунок потужності виробництва тобраміцину.....	28
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу тобраміцину <i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO	30
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ТОБРАМІЦИНУ	32
4.1. Вибір умов і способу культивування <i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO	32
4.2. Вибір типу ферментера.....	33
4.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для одержання тобраміцину.....	33
4.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>S. tenebrarius</i> Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO.....	35
4.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	38
4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівних апаратах.....	40
4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	42
4.5. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу тобраміцину	43
4.6. Обґрунтування вибору піногасника.....	43
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	46
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	51
РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТОБРАМІЦИНУ	61
7.1. Обґрунтування етапу виділення тобраміцину.....	61
7.1.1. Виділення біомаси з культуральної рідини після здійснення біосинтезу.....	61
7.1.2. Обґрунтування етапу екстракції тобраміцину.....	62
7.1.3. Обґрунтування етапу очищення тобраміцину.....	63
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ТОБРАМІЦИНУ	65
8.1 Мікробіологічний контроль.....	65
8.1.1 Висів на агаризовані поживні середовища	65
8.1.2 Мікроскопіювання	66

8.2 Технологічний контроль.....	67
8.2.1 Визначення концентрації біомаси <i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO	67
8.2.2 Визначення концентрації тобраміцину	68
8.2.3 Визначення концентрації джерела Карбону у середовищі.....	68
8.2.4 Визначення концентрації джерела Нітрогену у середовищі	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	70

ВСТУП

Резистентність до антимікробних препаратів стала критичною глобальною проблемою охорони здоров'я, що суттєво впливає на лікування інфекцій та клінічні результати. Зростаюча поширеність резистентних штамів мікробів призвела до підвищення рівня захворюваності та смертності, особливо серед вразливих груп населення, включаючи дітей, людей похилого віку та осіб з ослабленим імунітетом. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) оцінює, що до 2050 року антибіотикорезистентність може призвести до 10 мільйонів смертей щорічно, що підкреслює нагальну потребу в нових антимікробних засобах [1].

Більшість відомих на сьогодні антимікробних препаратів були спочатку виділені з актиноміцетів, особливо з роду *Streptomyces*. Отримані речовини включають усі важливі класи ліків, що використовуються сьогодні в клініці, такі як β -лактами, тетрацикліни, макроліди, аміноглікозиди або глікопептиди [2].

Серед аміноглікозидів особливу увагу привертає тобраміцин — перспективний антибіотик широкого спектру дії, який проявляє високу ефективність проти багатьох грамнегативних патогенів, включаючи *Pseudomonas aeruginosa* та *Escherichia coli*. Завдяки своїм бактерицидним властивостям і стабільності до багатьох механізмів резистентності, тобраміцин активно вивчається як потенційний засіб у терапії важких та мультирезистентних інфекцій. Його клінічне значення підтверджується застосуванням у лікуванні як системних, так і локальних інфекцій, зокрема в легневих захворюваннях, пов'язаних із муковісцидозом. Природним продуцентом тобраміцину є *Streptomyces tenebrarius*, представник ґрунтових актиноміцетів, що додатково підкреслює важливість вивчення біосинтетичних можливостей цього роду [3].

Актуальність. З огляду на зростаючу потребу в ефективних антибіотиках для боротьби з мультирезистентними бактеріями, мікробне продукування

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Давидчук В.О.				ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							8	2
Керівник	Лич І.В.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.						8		
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

тобраміцину є перспективним напрямом, зокрема за участю *Streptomyces tenebrarius*, здатного синтезувати цей препарат. Пошук та селекція штамів з підвищеним виходом тобраміцину відкриває можливості для оптимізації біотехнологічного процесу та зниження вартості виробництва.

Новизна. Новизною роботи є використання для біосинтезу тобраміцину штаму *Streptomyces tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEr*-tobO, який порівняно з іншими біологічними агентами характеризується вищою здатністю до синтезу тобраміцину (4 г/л) на достатньо дешевому середовищі (вартість 22,95 грн/л).

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ТОБРАМІЦИНУ

1.1. Структурні особливості

Тобраміцин (0-[3-аміно-3-дезоксид-а-D-глюкопіранозил-(1-4)]-0-[2,6-діаміно-2,3,6-тридеоксид-D-рибо-гексопіранозил-(1-6)]-2-дезоксистрептамін) - аміноглікозидний антибіотик, який є одним із членів комплексу антибіотиків широкого спектру дії, небраміцину, виділеного в 1967 році працівниками Eli Lilly and Company. Комплекс небраміцину було розділено на фактори, і один компонент, фактор небраміцину 6, продемонстрував активність *in vitro*, що може бути клінічно корисним. Згодом фактор 6 був названий тобраміцином, оскільки він був отриманий із *Streptomyces tenebrarius* [4].

Тобраміцин за структурою найбільш схожий на представників групи аміноглікозидів канаміцину. Тобраміцин складається з 2,6-діаміно-2,6-дідезоксидцукру та 3-аміно-3-дезоксидглюкози, пов'язаної з 4- та 6-гідроксильними групами 2-дезоксистрептаміну (рис. 1.1). Молекула вільно розчинна у воді, її молекулярна маса становить 467,5 г/моль. У певному сенсі всі аміноглікозидні антибіотики, розроблені після стрептоміцину, є похідними 2-дезоксистрептаміну. Тобраміцин відрізняється від канаміцину В і 3',4'-дідезоксидканаміцину В кількістю гідроксильних груп на 2,6-діаміно-2,6-дідезоксидцукрі. Тобраміцин подібний до гентаміцину С_{1а}, який є частиною комплексу гентаміцину С [4].

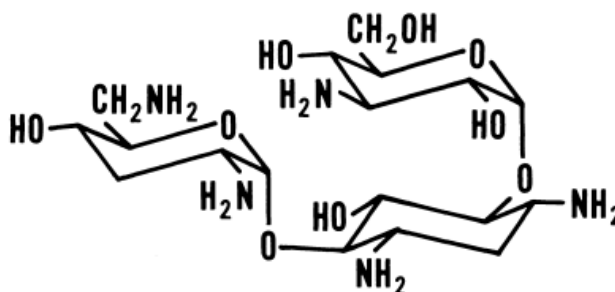


Рис. 1.1. Хімічна структура тобраміцину

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Давидчук В.О.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТОБРАМІЦИНУ		
Консульт.							
Керівник	Лич І.В.						
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						
					Літ.	Арк.	Аркушів
						10	4
					Кафедра БТМ 10		

1.2. Фізичні властивості

Тобраміцин добре розчинний у воді і стабільний протягом тривалого періоду в розчині при рН 1-11 і при температурі 5-37 °С [2]. Тобраміцин сумісний з більшістю рідин для внутрішньовенного введення, які зараз використовуються у всьому світі. Сполука не сумісна з розчинами гепарину і може хімічно взаємодіяти з β-лактамами сполуками родин пеніциліну, цефалоспорину та цефаміцину; така взаємодія залежить від концентрації та рН як тобраміцину, так і сполуки β-лактаму [4].

1.3. Антибактеріальна активність

Тобраміцин діє проти бактерій так само, як і всі інші аміноглікозиди, що містять дезоксистрептамін. Він пригнічує синтез білка через взаємодію з 30S рибосомальною субодиницею. Зв'язування тобраміцину з субодиницею є постійним; ця субодиниця видалається з пулу полісом, і таким чином синтез білка пригнічується бактерицидним чином. Кілька факторів необхідні для надходження таких сполук у клітини бактерій, а зв'язування з рибосомою 30S є енерговитратним процесом. Цією вимогою, ймовірно, пояснюється недостатня активність аміноглікозидів в анаеробному середовищі і проти анаеробних мікроорганізмів [5].

Тобраміцин активний проти багатьох аеробних і факультативних грамнегативних бактерій, включаючи *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) і *Acinetobacter spp* [6]. Тобраміцин практично неактивний щодо *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* (пнеумососі) [7], *Haemophilus spp.* і *Legionella spp.* внаслідок низької внутрішньоклітинної концентрації. Тобраміцин також не є кращим аміноглікозидом при мікобактеріальних інфекціях або інфекціях, спричинених *Yersinia spp.* і *Francisella spp.* Як і для всіх аміноглікозидів, для прояву ефекту тобраміцин потребує аеробного метаболізму, тому він не діє проти анаеробних бактерій [6].

1.4. Застосування тобраміцину

Основна роль тобраміцину полягає в поєднанні з бета-лактамічним агентом проти грамнегативних бактеріальних патогенів. В емпіричних умовах мета комбінованої терапії полягає в тому, щоб забезпечити емпіричний режим широкого спектру дії, який, ймовірно, включатиме принаймні один агент, активний проти підозрюваного етіологічного бактеріального збудника. Ця практика спеціально схвалена та детально описана в останніх настановах з лікування пневмонії і особливо важлива для пацієнтів, які перебувають у критичному стані або мають підозру на інфекцію, спричинену мікроорганізмами, стійкими до різних лікарських засобів [7].

При певних інфекціях із задокументованою чутливістю тобраміцин може бути доданий як частина комбінованої схеми через його швидкий бактерицидний ефект і коли інфекцію важко ліквідувати. Це вірно в умовах муковісцидозу та синьогнійного ендокардиту. Нарешті, з появою мультирезистентних грамнегативних мікроорганізмів клініцисти можуть бути змушені використовувати тобраміцин, коли інші агенти не залишаються чутливими, часто за рахунок підвищення токсичності. Рівень клінічної відповіді 90% або більше досягається, коли пікові концентрації аміноглікозидів у 8-10 разів перевищують мультирезистентність інфікованого організму [7].

Подібно до амікацину та гентаміцину, побічні ефекти, такі як ниркова токсичність, ототоксичність, вестибулярна токсичність і нервово-м'язова блокада, зробили тобраміцин не ідеальним засобом. Однак збільшення кількості мультирезистентних мікроорганізмів призвело до відновлення користі від тобраміцину та інших аміноглікозидних агентів [7].

Управління з контролю за продуктами і ліками США (FDA) схвалило системне введення (внутрішньом'язове або внутрішньовенне) тобраміцину для лікування різних повторних інфекцій, спричинених чутливими мікроорганізмами, головним чином грамнегативними бактеріями та *Staphylococcus aureus* (штами, що продукують пеніциліназу та не продукують пеніциліназу) [8].

Інфекції, спричинені мікроорганізмами, чутливими до тобраміцину, можуть відрізнятися за своєю природою та включати септицемію, інфекції нижніх дихальних шляхів, інфекції центральної нервової системи (ЦНС), такі як менінгіт, інтраабдомінальні інфекції, інфекції шкіри та підшкірної клітковини, остеомієліт та ускладнені інфекції сечовивідних шляхів [8].

Інгаляційний тобраміцин схвалений FDA для лікування муковісцидозу (МВ) у пацієнтів віком від шести років, хворих на *Pseudomonas aeruginosa*. У рекомендаціях щодо муковісцидозу зазначено доцільність постійного використання інгаляційного тобраміцину з метою покращення легеневої функції, зниження частоти загострень та підвищення якості життя пацієнтів [5].

Тобраміцин для офтальмологічного застосування схвалений FDA для лікування зовнішніх очних інфекцій, спричинених чутливими організмами у дорослих і дітей [8].

Незазначене застосування тобраміцину включає внутрішньошлуночкове введення для лікування інфекцій центральної нервової системи, пов'язаних із внутрішньошлуночковим катетером. Згідно з рекомендаціями Американської академії алергії, астми та імунології, тобраміцин можна використовувати для профілактики бактеріальних інфекцій дихальних шляхів у пацієнтів із первинними імунодефіцитними захворюваннями [8].

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Streptomyces tenebrarius є важливим промисловим мікроорганізмом, що виробляє ряд аміноглікозидних антибіотиків, серед яких особливу цінність становить тобраміцин — антибіотик широкого спектра дії, активний проти грамнегативних збудників [9].

З наявних літературних джерел було відібрано шість штамів *Streptomyces tenebrarius*, які потенційно виробляли тобраміцин.

Штами *S. tenebrarius* ST318 та ST316 [9] є генетично модифікованими і були створені з метою інтенсифікації біосинтезу тобраміцину. Обидва штами культивувалися протягом 120 годин. Особливістю поживних середовищ для даних штамів є використання комбінованих джерел вуглецю (глюкоза та кукурудзяний крохмаль), а також соєвого борошна як багатого на білок джерела органічного азоту. Додатковим стимулятором росту і продуктивності є бобова олія, яка може слугувати джерелом жирних кислот, необхідних для вторинного метаболізму.

Штами *Streptomyces tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ$, Tb- $\Delta aprJ-\Delta tobR$ та Tb- $\Delta aprJ-\Delta tobR/ermEr^*-tobO$ також є мутантними, які були сконструйовані з метою підвищення продуктивності синтезу тобраміцину. Генетичні зміни включали послідовну інактивацію гена *aprJ* та *tobR*, а також конститутивну експресію гена *tobO* під контролем сильного промотора *ermEr** у батьківському штамі *S. tenebrarius* Tb [10].

На відміну від них, штам *S. tenebrarius* TD507 [11] є дикого типу (не генетично модифікований) і демонструє значно нижчий рівень продукції тобраміцину. Культивування тривало 70 годин, а середовище характеризується

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Давидчук В.О.				РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							14	13
Керівник	Лич І.В.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.						14		
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

підвищеним вмістом мікроелементів, зокрема іонів марганцю, міді, кобальту та заліза, що свідчить про намагання оптимізувати метаболічні шляхи штаму за рахунок їх ферментативного впливу. Додатковим компонентом є піногасник Pluronic, який використовується при інтенсивному аеруванні у ферментаторах для запобігання надмірному піноутворенню.

Незважаючи на схожі технологічні параметри вирощування, штами демонстрували різну біосинтетичну активність. Це зумовлено наявністю специфічних генетичних змін, які впливали на метаболічні шляхи продуцента. Генетична реконструкція дозволила перерозподілити потоки вторинного метаболізму та активізувати шлях біосинтезу тобраміцину, що підтверджується різницею у кінцевих концентраціях антибіотика у культуральній рідині.

У таблиці 2.1 представлено порівняльну характеристику штамів *Streptomyces tenebrarius*, які відрізняються генетичними особливостями, тривалістю культивування, складом поживних середовищ і рівнем продуктивності.

Особливості одержання тобраміцину на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація антибіотика, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>S. tenebrarius</i> ST316	<u>Одержання посівного матеріалу:</u> глюкоза – 5; кукурудзяне борошно – 20; кукурудзяний крохмаль – 20; соєвий шрот – 15; KCl – 1; CaCl ₂ - 0,25; KH ₂ PO ₄ - 0,5; MgSO ₄ - 5. <u>Ферментаційне середовище:</u> глюкоза - 15; кукурудзяний крохмаль – 20; соєве борошно - 35; бобова олія – 10; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 7; CaCO ₃ - 7; ZnSO ₄ - 0,1; MgSO ₄ - 11.	120	-	Культивування для вирощування посівного матеріалу відбувається у колбі на 250 мл за таких параметрів: температура - 37 °C і 300 об/хв протягом 16 год. Виробниче культивування відбувається за тих самих умов.	Xiao, J., Li, H., Wen, S., & Hong, W. (2014). Concentrated biosynthesis of tobramycin by genetically engineered <i>Streptomyces tenebrarius</i> . <i>The Journal of general and applied microbiology</i> , 60(6), 256–261. https://doi.org/10.2323/jgam.60.256 [9]
<i>Streptomyces tenebrarius</i> ST318	<u>Одержання посівного матеріалу:</u> глюкоза – 5; кукурудзяне борошно – 20; кукурудзяний крохмаль – 20; соєвий шрот – 15; KCl – 1;	120	-	Культивування для вирощування посівного матеріалу відбувається у колбі на 250 мл за таких параметрів: температура - 37 °C і 300 об/хв протягом 16 год.	Xiao, J., Li, H., Wen, S., & Hong, W. (2014). Concentrated biosynthesis of tobramycin by genetically engineered <i>Streptomyces tenebrarius</i> . <i>The Journal of general and applied microbiology</i> , 60(6), 256–261.

	CaCl ₂ - 0,25; KH ₂ PO ₄ - 0,5; MgSO ₄ - 5. <u>Ферментаційне середовище:</u> глюкоза - 15; кукурудзяний крохмаль – 20; соєве борошно - 35; бобова олія – 10; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 7; CaCO ₃ - 7; ZnSO ₄ - 0,1; MgSO ₄ - 11.			Виробниче культивування відбувається за тих самих умов.	https://doi.org/10.2323/jgam.60.256 [9]
<i>Streptomyces tenebrarius</i> TD507	Глюкоза – 8; (NH ₄)SO ₄ – 2; KH ₂ PO ₄ – 0,08; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5; ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01; FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01; CaCl ₂ – 2; MnSO ₄ ×H ₂ O – 0,02 мг; CuSO ₄ ×5H ₂ O - 0,02 мг; CoCl ₂ ×6H ₂ O – 0,02 мг; піногасник Pluronic – 1 мл.	70	0,04	Ферментатори засівали 0,3 мл (0,1% [об/об]) вихідної культури. Швидкість аерації становила 1 об/об/хв. рН середовища підтримували на рівні 6,8 шляхом автоматичного додавання 0,1 N NaOH, а температуру підтримували на рівні 37°C протягом усього культивування.	Borodina, I., Schöller, C., Eliasson, A., & Nielsen, J. (2005). Metabolic Network Analysis of <i>Streptomyces tenebrarius</i> , a <i>Streptomyces Species</i> with an Active Entner-Doudoroff Pathway. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 71(5), 2294–2302. https://doi.org/10.1128/aem.71.5.2294-2302.2005 [11]
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb-Δ <i>aprJ</i>	Глюкоза - 15; соєве борошно – 50; рибне борошно – 10; кукурудзяне борошно – 10; соєва олія – 30; порошок шовкопряда – 6; NH ₄ Cl – 8;	144	2,64	Вирощування інокуляту у колбах на качалках з об'ємом 250 мл та культивували при 37 °C, 220 об/хв протягом 20 годин.	Feng, Yun & Jiang, Yiqi & Chen, Xutong & Zhu, Li & Xue, Hailong & Wu, Mianbin & Yang, Lirong & Yu, Haoran & Lin, Jianping. (2024). Improving the production of carbamoyltobramycin by an

	CaCO ₃ – 7; CaCl ₂ – 0,25.			Культивування під час виробничого біосинтезу проходило при 37 °С, 220 об/хв.	industrial <i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> through metabolic engineering. Applied Microbiology and Biotechnology. 108. 10.1007/s00253-024-13141-2 [10].
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb-Δ <i>aprJ</i> - Δ <i>tobR</i>	Глюкоза - 15; соєве борошно – 50; рибне борошно – 10; кукурудзяне борошно – 10; соєва олія – 30; порошок шовкопряда – 6; NH ₄ Cl – 8; CaCO ₃ – 7; CaCl ₂ – 0,25.	144	3,23	Вирощування інокуляту у колбах на качалках з об'ємом 250 мл та культивували при 37 °С, 220 об/хв протягом 20 годин. Культивування під час виробничого біосинтезу проходило при 37 °С, 220 об/хв.	Feng, Yun & Jiang, Yiqi & Chen, Xutong & Zhu, Li & Xue, Hailong & Wu, Mianbin & Yang, Lirong & Yu, Haoran & Lin, Jianping. (2024). Improving the production of carbamoyltobramycin by an industrial <i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> through metabolic engineering. Applied Microbiology and Biotechnology. 108. 10.1007/s00253-024-13141-2 [10].
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb-Δ <i>aprJ</i> - Δ <i>tobR/ermEp</i> *- <i>tobO</i>	Глюкоза - 15; соєве борошно – 50; рибне борошно – 10; кукурудзяне борошно – 10; соєва олія – 30; порошок шовкопряда – 6; NH ₄ Cl – 8; CaCO ₃ – 7; CaCl ₂ – 0,25.	144	4	Вирощування інокуляту у колбах на качалках з об'ємом 250 мл та культивували при 37 °С, 220 об/хв протягом 20 годин. Культивування під час виробничого біосинтезу проходило при 37 °С, 220 об/хв.	Feng, Yun & Jiang, Yiqi & Chen, Xutong & Zhu, Li & Xue, Hailong & Wu, Mianbin & Yang, Lirong & Yu, Haoran & Lin, Jianping. (2024). Improving the production of carbamoyltobramycin by an industrial <i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> through metabolic engineering. Applied Microbiology and Biotechnology. 108. 10.1007/s00253-024-13141-2 [10].

На основі порівняльного аналізу штамів *Streptomyces tenebrarius*, представлених у таблиці 2.1, встановлено, що найбільш ефективними продуцентами тобраміцину є генетично модифіковані штами з інактивацією генів *aprJ* і *tobR*, а також із додатковою експресією гена *tobO* (штами *Tb-ΔaprJ-ΔtobR* та *Tb-ΔaprJ-ΔtobR/ermEp*-tobO*). Вони продемонстрували найвищі рівні продукції тобраміцину — 2,64 г/л, 3,23 г/л та 4,00 г/л відповідно.

Для штамів ST316 і ST318 концентрація тобраміцину безпосередньо не визначалась. У відповідному джерелі [9] зазначено лише загальний вихід аміноглікозидних антибіотиків, до складу яких входить тобраміцин, — 4000 мкг/л. Через відсутність точних даних щодо питомого виходу тобраміцину ці штами не враховуватимуться при подальшому порівнянні.

Також не включено до порівняння штам дикого типу TD507, який показав найнижчий рівень продукції — лише 0,04 г/л, що є недостатнім для промислового застосування.

Ці дані свідчать про перевагу *S. tenebrarius Tb-ΔaprJ-ΔtobR/ermEp*-tobO* за продуктивністю, тому подальший аналіз повинен включати порівняння вартості поживних середовищ (табл. 2.2) для визначення найекономічнішого варіанту біосинтезу.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування *Streptomyces tenebrarius* для одержання тобраміцину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Streptomyces tenebrarius</i> <i>Tb-ΔaprJ</i>	Глюкоза	15	39	0,585	https://soda.kiev.ua/ua/p92855184-glyukoza-pischevaya.html
	соєве борошно	50	71	3,55	https://prom.ua/ua/p975818606-muka-soevaya.html
	рибне борошно	10	64	0,64	https://soda.kiev.ua/ua/rybnaya-muka-kormovaya-64-es.html
	кукурудзяне борошно	10	25	0,25	https://prom.ua/ua/p1268969849-kukuruznaya-muka.html

	соєва олія	30	37	1,11	https://prom.ua/ua/p2070551999-soevoe-maslosoevoe-maslo.html
	порошок шовкопряда	6	2700	16,2	https://www.thailandunique.com/insect-bug-flour-powder/silkworm-moth-pupae-flour?srsltid=AfmBOoruMw6a-CgatJJF4k1Qt-nmioabKcWcPrNyppgKy6g_TF2FaLZ
	NH ₄ Cl	8	35	0,28	https://soda.kiev.ua/ua/p596870174-ammonij-hloristyj-dlya.html
	CaCO ₃	7	47,7	0,33	https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj?srsltid=AfmBOor8pq2uIBqzj9xmLMdrwJHKI1WEaMyJvh-bigS4ORzRtXYd6C-f
	CaCl ₂	0,25	8	0,002	https://flagma.ua/uk/kalciy-hloristy-antigololedny-reagent-o12879933.html
Вартість 1 л поживного середовища – 22,95 грн					
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR$	Глюкоза	15	39	0,585	https://soda.kiev.ua/ua/p92855184-glyukoza-pischevaya.html
	соєве борошно	50	71	3,55	https://prom.ua/ua/p975818606-muka-soevaya.html
	рибне борошно	10	64	0,64	https://soda.kiev.ua/ua/rybnaya-muka-kormovaya-64-es.html
	кукурудзяне борошно	10	25	0,25	https://prom.ua/ua/p1268969849-kukuruznaya-muka.html
	соєва олія	30	37	1,11	https://prom.ua/ua/p2070551999-soevoe-maslosoevoe-maslo.html
	порошок шовкопряда	6	2700	16,2	https://www.thailandunique.com/insect-bug-flour-powder/silkworm-moth-pupae-flour?srsltid=AfmBOoruMw6a-CgatJJF4k1Qt-nmioabKcWcPrNyppgKy6g_TF2FaLZ
	NH ₄ Cl	8	35	0,28	https://soda.kiev.ua/ua/p596870174-ammonij-hloristyj-dlya.html

	CaCO ₃	7	47,7	0,33	https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj?srsltid=AfmBOor8pq2uIBqzj9xmLMdrwJHKI1WEaMyJvh-bigS4ORzRtXYd6C-f
	CaCl ₂	0,25	8	0,002	https://flagma.ua/uk/kalciy-hloristy-antigoleledny-reagent-o12879933.html
Вартість 1 л поживного середовища – 22,95 грн					
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb-Δ <i>aprJ-ΔtobR/ermE p*-tobO</i>	Глюкоза	15	39	0,585	https://soda.kiev.ua/ua/p92855184-glyukoza-pischevaya.html
	соєве борошно	50	71	3,55	https://prom.ua/ua/p975818606-muka-soevaya.html
	рибне борошно	10	64	0,64	https://soda.kiev.ua/ua/rybnaya-muka-kormovaya-64-es.html
	кукурудзяне борошно	10	25	0,25	https://prom.ua/ua/p1268969849-kukuruznaya-muka.html
	соєва олія	30	37	1,11	https://prom.ua/ua/p2070551999-soevoe-maslosoevoe-maslo.html
	порошок шовкопряда	6	2700	16,2	https://www.thailandunique.com/insect-bug-flour-powder/silkworm-moth-pupae-flour?srsltid=AfmBOoruMw6a_CgatJf4k1Qt-nmioabKcWcPrNyppgKy6g_TF2FaLZ
	NH ₄ Cl	8	35	0,28	https://soda.kiev.ua/ua/p596870174-ammonij-hloristyj-dlya.html
	CaCO ₃	7	47,7	0,33	https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-vuglekyslyj?srsltid=AfmBOor8pq2uIBqzj9xmLMdrwJHKI1WEaMyJvh-bigS4ORzRtXYd6C-f
	CaCl ₂	0,25	8	0,002	https://flagma.ua/uk/kalciy-hloristy-antigoleledny-reagent-o12879933.html
Вартість 1 л поживного середовища – 22,95 грн					

Серед проаналізованих штамів *Streptomyces tenebrarius*, вартість поживних середовищ для всіх представників є однаковою — по 22,95 грн/л, тому для

остаточного порівняння доцільно врахувати умовну вартість 1 г тобраміцину (табл. 2.3), що дозволить більш точно оцінити економічну доцільність використання кожного з продуцентів.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г тобраміцину

Біологічний агент	Концентрація тобраміцину, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного тобраміцину за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г тобраміцину, грн/г
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- $\Delta aprJ$	2,64	144	0,019	22,95	8,69
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR$	3,23	144	0,022	22,95	7,10
<i>Streptomyces tenebrarius</i> Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR/ermEp$ *- <i>tobO</i>	4	144	0,027	22,95	5,73

У таблиці 2.3 показано, що умовна вартість 1 г тобраміцину для штаму *S. tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR/ermEp$ *-*tobO* становить 5,73 грн, для *S. tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR$ — 7,10 грн, тоді як для *S. tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ$ — 8,69 грн. Отже, Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR/ermEp$ *-*tobO* є найбільш економічно вигідним продуцентом серед розглянутих штамів.

Враховуючи як високий рівень біосинтезу тобраміцину, так і найнижчу умовну вартість його отримання, штам *S. tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ$ - $\Delta tobR/ermEp$ *-*tobO* є оптимальним біологічним агентом для промислового культивування з метою одержання цього антибіотика.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму *Streptomyces tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO – продуцента тобраміцину

Тривалість культивування 144 год, концентрація тобраміцину в культуральній рідині становить 4 г/л. В статті [10], автори визначили, що концентрація біомаси становить 148 г/л. Це значення стосується вологого осаду клітин (wet cell weight), що включає не лише суху масу біомаси, а й вміст води, тому суха маса (dry weight) буде приблизно у 4–5 разів меншою, тобто орієнтовно 27–37 г/л. Приймаємо середнє значення 32 г/л біомаси.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу тобраміцину. Поживне середовище для культивування штаму *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO включає глюкозу та соєву олію.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 4 г тобраміцину. Молекулярна маса тобраміцину ($C_{18}H_{37}N_5O_9$) становить приблизно 468 г/моль. Отже, у 468 г антибіотику міститься 216 г Карбону, а в 4 г тобраміцину ($216 \times 4 / 468 = 1,87$ г Карбону).

Молекулярна маса глюкози становить 180, формула $C_6H_{12}O_6$. Значить, у 180 г глюкози міститься 72 г карбону, а 1,87 г вуглецю міститься в $180 \times 1,87 / 72 = 4,68$ г глюкози.

Соєва олія складається з 50–60% лінолевої, 20–30% олеїнової, 6–10% пальмітинової та 5–10% ліноленової кислот [12]. Отже розрахуємо вміст вуглецю в соєвій олії:

- 55% лінолева кислота ($C_{18}H_{32}O_2$, $M = 280$ г/моль, $C = 216$ г $\approx 77,14\%$);
- 25% олеїнова кислота ($C_{18}H_{34}O_2$, $M = 282$ г/моль, $C = 216$ г $\approx 76,6\%$);
- 8% пальмітинова кислота ($C_{16}H_{32}O_2$, $M = 256$ г/моль, $C = 192$ г $\approx 75\%$);
- 7% ліноленова кислота ($C_{18}H_{30}O_2$, $M = 278$ г/моль, $C = 216$ г $\approx 77,7\%$).

Тобто середній вміст Карбону в соєвій олії становить $= 0,55 \times 0,7714 + 0,25 \times 0,766 + 0,08 \times 0,75 + 0,07 \times 0,777 = 0,730$ г (73%). $4 \times 73\% = 2,92$ г олії.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 32 г біомаси становить $32 \times 0,5 = 16$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(16 \times 100) / 40 = 40$ г глюкози.

З попередніх розрахунків знаємо, що вміст вуглецю в соєвій олії становить 73%, тому для синтезу біомаси необхідно $16/0,73 = 21,91$ г соєвої олії.

Отже загальний вміст компонентів для синтезу тобраміцину та біомаси, які є джерелом вуглецю, становить:

- глюкоза – $4,68 + 40 = 44,68$ г. Також врахуємо 40% витрат на «холосте окиснення», отже $44,68 \times 0,4 + 44,68 = 63$ г.

- соєва олія – $2,92 + 21,91 = 24,83$ г. Також врахуємо 40% витрат на «холосте окиснення», отже $24,83 \times 0,4 + 24,83 = 35$ г.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 32 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 3,2 г.

Джерелами азоту в середовищі є як неорганічна сполука — хлорид амонію NH_4Cl , так і органічні компоненти — соєве, рибне, кукурудзяне борошно та порошок шовкопряда.

Розрахуємо кількість хлориду амонію, необхідну для одержання 32 г/л біомаси. Молярна маса хлориду амонія (NH_4Cl) становить 53,5 г/моль. Отже у 53,5 г хлориду амонія міститься 14 г Нітрогену, тоді 3,2 г Нітрогену буде міститись у $(53,5 \times 3,2) / 14 = 12,2$ г солі. Для одержання 32 г/л біомаси вміст NH_4Cl у середовищі культивування повинен становити 12,2 г/л.

Потреби для синтезу тобраміцину. Розрахуємо, скільки азоту (за елементом N) міститься в 4 г тобраміцину. Молекулярна маса тобраміцину ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_9$) становить приблизно 468 г/моль. Отже, у 468 г антибіотику міститься 70 г Нітрогену, а в 4 г тобраміцину $(70 \times 4) / 468 = 0,6$ г Нітрогену.

Отже у 53,5 г хлориду амонія міститься 14 г Нітрогену, тоді 0,6 г Нітрогену буде міститись у $(53,5 \times 0,6) / 14 = 2,29$ г солі.

Розрахунок вмісту органічного азоту. Наступним джерелом азоту в середовищі є соєве борошно. Хоча точне значення вмісту азоту в ньому не визначене, відомо, що воно містить близько 49 г білка на 1 г борошна [13], основним структурним елементом якого є азот. Щоб визначити вміст азоту в білку, використовують спеціальний азотний коефіцієнт, який дозволяє перерахувати білкову масу на вміст азоту. Цей коефіцієнт базується на середньому вмісті азоту в білкових молекулах і застосовується у зворотному розрахунку:

$$\text{Азот (\%)} = \text{Білок (\%)} / \text{коефіцієнт}$$

Для більшості білків використовується коефіцієнт 6,25, оскільки в середньому білки містять приблизно 16 % азоту ($1 / 0,16 \approx 6,25$). Отже якщо соєве борошно містить 49 г білка, тоді $49 / 6,25 = 7,84$ г азоту міститься в 100 г соєвого борошна.

Якщо в 100 г соєвого борошна міститься 7,84 г азоту, то в 50 г борошна міститься $50 \times 7,84 / 100 = 3,92$ г азоту.

Наступним джерелом органічного Нітрогену є рибне борошно, яке в своєму складі містить від 50 до 60% білку [14]. За аналогічним принципом знаходимо вміст азоту в 50 г білка: $50 / 6,25 = 8$ г Нітрогену. Отже в 100 г рибного борошна міститься 8 г Нітрогену, а в 10 г – 0,8 г азоту.

Відомо, що вміст білку в кукурудзяному борошні становить 7 г на 100 г [15]. Відповідно, кількість азоту в 7 г білку становить: $7 / 6,25 = 1,12$ г азоту. Отже у 100 г кукурудзяного борошна міститься 1,12 г азоту, отже в 10 г борошна – 0,112 г азоту.

Четвертим джерелом органічного азоту є порошок шовкопряда, який було додано в кількості 6 г. Вміст білку в порошку становить близько 55 г/100 г [16], тому кількість азоту обчислюється так: $55 / 6,25 = 8,8$ г азоту. Тобто в 6 г порошку шовкопряда знаходиться: $6 \times 8,8 / 100 = 0,53$ г азоту.

Отже загальна кількість органічного азоту в середовищі становить $2,096 + 3,92 + 0,8 + 0,112 + 0,53 = 7,458$ г азоту, що повністю задовольняє потребу в біосинтезі тобраміцину та біомаси.

Нижче наведено склад середовища, яке ми будемо використовувати для подальшого виконання курсової роботи:

- Глюкоза - 63;
- соєве борошно – 50;
- рибне борошно – 10;
- кукурудзяне борошно – 10;
- соєва олія – 35;
- порошок шовкопряда – 6;
- NH_4Cl – 12,2;
- CaCO_3 – 7;
- CaCl_2 – 0,25.

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Розрахунок потреби в тобраміцині

Легеневі інфекції, спричинені *Pseudomonas aeruginosa*, є основною причиною зростання захворюваності та смертності у пацієнтів з муковісцидозом (МВ) [15]. Муковісцидоз – це аутосомно-рецесивне захворювання, пов’язане з мутаціями гена CFTR, який відповідає за синтез епітеліального іонного каналу. У гомозиготному стані мутації призводять до зниження секреції іонів хлору і, отже, рівня рН. Як наслідок, у легенях хворих на МВ накопичується густий слиз разом із захопленими бактеріями. Ефективність вроджених захисних механізмів знижується у зміненому мікросередовищі легень хворих на МВ, що сприяє розвитку та хронізації бактеріальних інфекцій. Останні є основними причинами загострення та смерті пацієнтів [16].

Для лікування пацієнтів з МВ та хронічною інфекцією *P. aeruginosa* використовувалися різні способи застосування антибіотиків: парентерально, інгаляційно та перорально. Лікування інгаляційними антибіотиками має кілька переваг, оскільки високі дози можуть бути доставлені безпосередньо до місця інфекції, тим самим мінімізуючи системний вплив, досягаючи при цьому адекватних локальних концентрацій для знищення мікробів [15]. Інгаляційний тобраміцин часто використовується як терапія першої лінії для ерадикації *P. aeruginosa*, оскільки це добре переносима та ефективна протипсевдомонадна терапія [17]. Було доведено, що інгаляційний розчин тобраміцину значно покращує функції легень, а також знижує рівень госпіталізації та покращує якість життя пацієнтів з МВ [18].

Наразі в Україні офіційної статистики щодо муковісцидозу немає, але наявні дані з неонатального скринінгу, державних програм та пацієнтських організацій свідчать, що щороку реєструється близько 250–300 нових випадків

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
Розроб.		Давидчук В.О.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							27	5
Керівник		Лич І.В.				Кафедра БТМ 27		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

цього захворювання, а загальна кількість пацієнтів станом на 2024 рік становить орієнтовно 1 000 осіб [19].

Подальші розрахунки потреби в тобраміцині наведені в таблиці 3.1, у рахуванням загальної кількості хворих на муковісцидоз.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в тобраміцині для лікування муковісцидозу у населення України

Кількість хворих	Курс лікування, діб	Кількість курсів на рік	Доза тобраміцину на добу, мг	Доза тобраміцину за курс, мг	Доза тобраміцину на 1 людину за рік, мг	Загальна кількість тобраміцину для всіх хворих, кг
1000	28	6	600	16800	100800	100,8

Отже, загальна потреба в тобраміцині становить 100,8 кг на рік, що при округленні дорівнює приблизно 101 кг, і ця кількість покриває повний курс лікування муковісцидозу для всіх хворих.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

На фармацевтичному ринку України представлені різні форми тобраміцину, проте інгаляційні форми, які є рекомендованими для лікування хронічних легеневих інфекцій у пацієнтів з муковісцидозом, з'явилися лише нещодавно, зокрема препарат «Тобраміцин-Віста» [20], який виготовляється за кордоном і імпортується в Україну. Вітчизняні виробники пропонують лише очні краплі, такі як «Тобраміцин-Фармекс» [21], та розчин для ін'єкцій «Браксон» [22], призначені для лікування очних та системних бактеріальних інфекцій відповідно. Слід зазначити, що в Україні немає власного виробництва тобраміцину, і всі лікарські форми імпортуються або виготовляються під ліцензією іноземних компаній. Тому доцільно передбачити, що наш препарат задовольнятиме приблизно 15 % річної потреби в тобраміцині на українському ринку. Такий підхід враховує реалії ринку, дозволяє об'єктивно оцінити обсяг

виробництва та збуту і закладає основу для поступового нарощування частки продукту в майбутньому. Таким чином загальна потужність виробництва тобраміцину становитиме:

$$101 \text{ кг} \times 15 \% = 15,15 \text{ кг.}$$

Далі нам потрібно розрахувати кількість культуральної рідини, яка необхідна для виробництва тобраміцину обраним продуцентом *S. tenebrarius* Тб-ΔарJ-ΔtobR/ermEp*-tobO, для задоволення потреби. Зі статті [10], знаємо, що продуцент синтезує тобраміцин в концентрації 4 г/л (кг/м³), отже об'єм культуральної рідини (X), необхідної для отримання 3 кг тобраміцину, становить:

$$4 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3 \qquad X = (15,15 \times 1) / 4 = 3,78 \text{ м}^3$$

$$15,15 \text{ кг} - X$$

Втрати тобраміцину при виділенні становлять 40%. У цьому разі необхідно отримати таку кількість культуральної рідини (V_{кр}):

$$3,78 \text{ м}^3 - 60 \%$$

$$V_{\text{кр}} - 100\%$$

$$V_{\text{кр}} = (3,78 \times 100) / 60 = 6,3 \text{ м}^3$$

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

Для забезпечення річної потреби в тобраміцині (згідно п.3.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 6,3 м³ культуральної рідини (V_{кр}).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів (T_{тр}) – 75, тоді об'єм культуральної рідини за добу (V_д) становить:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{тр}} = 6,3 / 75 = 0,084 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 0,084 \times 152,5) / 24 = 0,58 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{\text{ЦФ}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу ($T_{\text{К}} = 144$ год) та час підготовки ферментера до роботи ($T_{\text{ПР}} = 8,5$ год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера ($T_{\text{ПР}}$) включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Визначивши об'єм культуральної рідини за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_S , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{ГФ}} = V_{\text{ЦК}} / K_S = 0,58/0,6 = 0,96 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{\text{ГФ}} = 1 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу тобраміцину *Streptomyces tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEr*-tobO

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Робочий об'єм ферментера ($V_{\text{роб}}$) визначають за формулою:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{Г.ф}} \times K_{\text{зап}},$$

де: $V_{\text{Г.ф}}$ – геометричний об'єм ферментера; $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення, 0,5.

$$V_{\text{роб}} = 1 \times 0,6 = 0,6 \text{ м}^3 (600 \text{ л}).$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання $0,6 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 0,6 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3 (60 \text{ л}) \text{ посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEr*-tobO у посівному апараті об'ємом 100 л.

Для одержання 60 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.2}} = 60 \times 0,1 = 6 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного (6 л) можна одержати у процесі вирощування стрептоміцета у стандартному інокуляторі об'ємом 10 л.

6 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ л (600 мл) посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного одержують культивуванням *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEr*-tobO у 4 колбах на качалці об'ємом 750 мл по 150 мл поживного середовища.

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ

4.1. Вибір умов і способу культивування *Streptomyces tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ-\Delta tobR/ermE_p^*-tobO$

По відношенню до кисню штам *S. tenebrarius* Tb- $\Delta aprJ-\Delta tobR/ermE_p^*-tobO$ є облігатним аеробом [23]. Саме кисень є головним акцептором електронів у його енергетичному обміні, тому його дефіцит призводить до зниження біомаси та припинення синтезу вторинних метаболітів, зокрема тобраміцину. Для забезпечення ефективного біосинтезу антибіотика необхідно підтримувати високу концентрацію розчиненого кисню у культуральній рідині шляхом інтенсивної аерації та перемішування.

Оптимальною температурою для культивування, згідно з літературними даними [10], є 37 °С, а оптимальний рівень рН становить 7,0. Ці умови є оптимальними для росту багатьох інших мезофільних мікроорганізмів. Оскільки культивування проводиться у рідкому поживному середовищі, яке є багатим на джерела вуглецю та азоту, створюється сприятливе середовище не лише для штаму-продуцента, а й для потенційних контамінантів. Тому забезпечення асептичних умов є необхідною вимогою для збереження чистоти культури та запобігання впливу небажаних мікроорганізмів на хід біопроцесу. Асептика досягається завдяки стерилізації поживного середовища, обладнання та повітря, а також дотриманню стерильності під час інокуляції та відбору проб.

Процес культивування здійснюється глибинним періодичним способом, що є обґрунтованим вибором для таких продуцентів. Глибинне культивування дозволяє точно контролювати параметри середовища, зокрема температуру, рН, ступінь аерації, що є критично важливими для облігатних аеробів. Періодичний режим є оптимальним для синтезу вторинних метаболітів, оскільки дозволяє

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Давидчук В.О.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>							32	14
<i>Керівник</i>		Лич І.В.				Кафедра БТМ ³²		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

створити фазову структуру процесу — активне накопичення біомаси на першому етапі та максимальний вихід антибіотика на стаціонарній стадії, коли ріст клітин сповільнюється, а енергія спрямовується на продукцію метаболітів [24].

Отже, для забезпечення ефективного синтезу тобраміцину актиноміцетом *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp-tobO оптимальними є такі умови: аеробне культивування, дотримання асептики та глибинне періодичне культивування в рідкому поживному середовищі.

4.2. Вибір типу ферментера

Для біосинтезу тобраміцину актиноміцетом *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO доцільно використовувати глибинний аеробний ферментер періодичної дії з аераційно-мішальним перемішуванням. Такий тип біореактора дозволяє точно контролювати ключові параметри середовища, зокрема температуру, рН, рівень розчиненого кисню та стерильність, що є критично важливим для облигатного аероба, яким є даний штам.

Оскільки актиноміцети утворюють міцеліальні структури, що чутливі до механічного впливу, у якості мішалки доцільно застосовувати якорний або лопатевий тип із низькою швидкістю обертання. Це дозволяє уникнути руйнування клітинного апарату та забезпечити рівномірне перемішування культуральної рідини з достатнім доступом кисню. Вибір саме таких мішалок є обґрунтованим через зростання в'язкості середовища в процесі накопичення міцеліальної біомаси [25].

4.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

По відношенню до кисню штам *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO є облигатним аеробом [23]. Саме кисень є головним акцептором електронів у його енергетичному обміні, тому його дефіцит призводить до зниження біомаси та припинення синтезу вторинних метаболітів, зокрема тобраміцину. Для забезпечення ефективного біосинтезу антибіотика необхідно підтримувати високу концентрацію розчиненого кисню у культуральній рідині шляхом

інтенсивної аерації та перемішування. Отже, в технологічній схемі необхідно передбачити стадії підготовки аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря здійснюється в окремих будівлях — компресорних відділеннях, оскільки витрати повітря під час ферментації будуть значними. На першому етапі повітря відбирають із навколишнього середовища за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником, розташованим у найвищій точці будівлі приблизно на висоті 18 метрів. Така висота забезпечує доступ до чистішого повітря, поза зоною пилових та інших забруднень, що характерні для нижніх поверхів та прилеглої території.

Після забору повітря здійснюється його попереднє очищення від великих часток пилу з розміром понад 50 мкм на плоских тканинних фільтрах грубого очищення. Цей етап необхідний для захисту подальшого обладнання, особливо компресорів і тонких фільтрів, а також для зменшення концентрації зважених частинок у повітрі перед стисканням.

Наступним етапом повітря стискається в компресорах або турбоповітродувках. Під час стиснення температура повітря підвищується до 120–200 °С, що частково знижує мікробіологічне забруднення та одночасно полегшує наступне видалення вологи. Стиснене повітря далі охолоджують до температури точки роси, що дозволяє конденсувати вологу і зібрати її у спеціальних ресиверах. Ресивери одночасно виконують функцію зменшення пульсацій руху повітря, що позитивно впливає на ефективність роботи наступних фільтрів та стабільність подачі повітря до ферментера.

Після охолодження та видалення конденсату повітря стабілізують за допомогою підігрівання паром до температури 45–50 °С у теплообмінниках, що дозволяє підтримувати постійний тиск і температуру подачі. Далі повітря проходить очищення в головних ємнісних набивних фільтрах, встановлених поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення 95 %. Завершальним етапом є стерилізація повітря в індивідуальних картриджних або мембранних фільтрах на ферментері, де ефективність очищення досягає 99,99 %. Таке повітря подається безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи та

колектори, що забезпечує його повну стерильність для підтримки аеробного росту мікроорганізмів [26].

Для забезпечення успішної ферментації повітря має бути повністю стерильним і вільним від будь-яких мікроорганізмів та зважених часток. Кількість мікроорганізмів у повітрі може варіюватися від 10 до 2000 на м³, а концентрація зважених часток — від 20 до 100 000 на м³, причому найбільш поширеними є грибкові спори (50 %) і грамнегативні бактерії (40 %). Для стерилізації повітря застосовують фільтрацію, тепло, ультрафіолетове випромінювання або очищення газу, при цьому тепло та фільтрація залишаються найпоширенішими методами. Теплова стерилізація повітря раніше здійснювалася через електричні нагрівальні пристрої, однак через високу вартість нині практично не застосовується. Натомість у промисловій ферментації використовують складчасті мембранні фільтри з целюлозного естеру, нейлону або полісульфону, які зручні в обслуговуванні та заміні. Мембранні картриджні фільтри компактніші й простіші у використанні, однак існують обмеження щодо видалення бактеріофагів, які можуть пригнічувати промислове бродіння. У боксах і лабораторіях, де працюють з посівною культурою, додатково застосовують ультрафіолетове опромінення повітря для підтримки стерильності [27].

4.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища культивування *Streptomyces tenebrarius* Tb-ΔaprJ-

ΔtobR/ermEp*-tobO - продуцента тобраміцину

Згідно зі здійсненими в розділі 3 розрахунками, виробничий біосинтез тобраміцину проходить у ферментері об'ємом 1 м³, що містить 0,6 м³ поживного середовища. Інокулянт отримують у три етапи: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л (табл. 4.1).

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

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, л	Об'єм посівного матеріалу (10%), л	Конденсат (10%), л	Об'єм підготовки поживного середовища, л
1000	0,6	600	60	60	480
100	0,6	60	6	6	48
10	0,6	6	0,6	0,6	4,8

Для виробничого біосинтезу тобраміцину продуцентом *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO використовуємо поживне середовище наступного складу (див. підрозділ 2.2):

- Глюкоза - 63;
- соєве борошно – 50;
- рибне борошно – 10;
- кукурудзяне борошно – 10;
- соєва олія – 35;
- порошок шовкопряда – 6;
- NH₄Cl – 12,2;
- CaCO₃ – 7;
- CaCl₂ – 0,25.

Культивування *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO у виробничих умовах буде проводитись у ферментері об'ємом 1 м³, при цьому робочий об'єм становитиме 60%. Підготовка посівного матеріалу відбуватиметься поетапно: спочатку в колбах на качалці, далі у посівних апаратах об'ємом 10 та 100 літрів.

Стерилізацію середовища для колб доцільно проводити в автоклаві через невеликий об'єм культуральної рідини (приблизно 600 мл). Такий об'єм забезпечує швидке й рівномірне прогрівання, що гарантує повну стерилізацію

без перегріву компонентів середовища. Крім того, автоклавування колб дозволяє зменшити ризик контамінації під час подальшого перенесення в інокулятор.

Натомість поживне середовище для інокуляторів і ферментера стерилізують безпосередньо в апаратах, оскільки об'єм середовища значно більший, і його перенесення після стерилізації створює ризик вторинного мікробного забруднення. Крім того, внутрішньоапаратна стерилізація дозволяє підтримувати стерильність усієї системи — корпусу, комунікацій, патрубків та трубопроводів — що є критично важливим для запобігання інфікуванню культури впродовж усього процесу біосинтезу.

До складу поживного середовища входять компоненти, що потребують попередньої підготовки перед їх додаванням. Зокрема, це карбонат кальцію, соєве та кукурудзяне борошно. Карбонат кальцію перед внесенням у середовище суспендують, щоб забезпечити рівномірний розподіл частинок у розчині. Така підготовка сприяє стабілізації рН під час стерилізації та процесу культивування, а також запобігає злипанню частинок і утворенню грудок у середовищі. Соєве та кукурудзяне борошно перед внесенням у поживне середовище піддають попередньому розварюванню. Така обробка сприяє переходу поживних речовин у більш доступну для мікроорганізмів форму. У процесі розварювання відбувається частковий гідроліз складних білків і вуглеводів, що підвищує засвоюваність джерел азоту, вуглецю та інших біогенних елементів. Крім того, термічна обробка зменшує в'язкість суміші, полегшує її перемішування й стерилізацію, а також руйнує антипоживні речовини, здатні пригнічувати ріст і розвиток мікроорганізмів.

Кальцій карбонат перед внесенням у середовище слід окремо суспендувати у воді в окремій ємності для забезпечення рівномірного розподілу в об'ємі. Соєве та кукурудзяне борошно спочатку суспендують у холодній воді, після чого суміш поступово нагрівають до температури 70–90 °С і витримують у цьому температурному діапазоні протягом 20–30 хвилин. Оскільки ці компоненти вимагають попереднього суспендування, доцільно визначити необхідну кількість води для їх підготовки. Співвідношення 1:4 (компонент : вода)

забезпечує оптимальну консистенцію суспензії, запобігаючи злипанню часток і надмірному розведенню середовища.

Особливості приготування цих компонентів наведені у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	CaCO ₃		Соєве борошно		Кукурудзяне борошно	
	Вміст, г	Об'єм води, мл	Вміст, г	Об'єм води, мл	Вміст, г	Об'єм води, мл
0,6	4,2	16,8	30	120	6	24
4,8	33,6	134,4	240	960	48	192
48	336	1344	2400	9600	480	1920
480	3360	13440	24000	96000	4800	19200

Нижче наведені деталі приготування та стерилізації середовища для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу.

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

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (600 мл). Аналізуючи склад поживного середовища для вирощування, його можна умовно розділити на такі композиції в залежності від режиму стерилізації компонентів:

Композиція А: глюкоза, соєве борошно, рибне борошно, кукурудзяне борошно, порошок шовкопряда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: NH₄Cl, CaCl₂ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Термолабільні компоненти як глюкоза, соєве борошно, кукурудзяне борошно, рибне борошно, порошок шовкопряда виносяться в окрему композицію (композиція А), яка матиме щадний режим стерилізації. Карбонат

кальцію стерилізується окремо від інших компонентів (композиція Б), оскільки він малорозчинний у воді та може викликати випадання осаду або утворення нерівномірної суспензії при автоклавуванні разом з іншими складниками середовища. Хлорид амонію та хлорид кальцію (композиція В) піддаються окремій стерилізації, оскільки для солей зазвичай застосовують більш жорсткий температурний режим стерилізації. Оскільки в соєвій олії не розмножуються бактерії, її не стерилізують і не включають до складу композицій.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 4.3:

Таблиця 4.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	63	37,8	А	450,5
Соеве борошно	50	30		
Кукурудзяне борошно	10	6		
Рибне борошно	10	6		
Порошок шовкопряда	6	3,6		
Вода		367 мл		
CaCO ₃	7	4,2	Б	21
Вода		17 мл		
NH ₄ Cl	12,2	7,32	В	107,5
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,25	0,15		
Вода		100 мл		
Соева олія	35	21	-	21
Всього:				600 мл

4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Для цієї стадії необхідно 5,4 л поживного середовища (див. табл. 2.1), а поділ композицій для стадії вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л, здійснюється аналогічно попередній стадії.

Композиція А: глюкоза, соєве борошно, рибне борошно, кукурудзяне борошно, порошок шовкопряда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: NH₄Cl, CaCl₂ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л наведений у табл. 4.4:

Таблиця 4.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4,8 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	63	302,4	А	3,89
Соєве борошно	50	240		
Кукурудзяне борошно	10	48		
Рибне борошно	10	48		
Порошок шовкопряда	6	22,8		
Вода		3,2 л		
CaCO ₃	7	33,6	Б	0,17
Вода		0,134 л		
NH ₄ Cl	12,2	58,56	В	0,57
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,25	1,2		
Вода		0,57 л		
Соєва олія	35	168	-	0,17
			Всього:	4,8 л

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Для цієї стадії необхідно 48 л поживного середовища (див. табл. 2.1), а поділ композицій для стадії вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л, здійснюється аналогічно попередній стадії.

Композиція А: глюкоза, соєве борошно, рибне борошно, кукурудзяне борошно, порошок шовкопряда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: NH₄Cl, CaCl₂ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л наведений у табл. 4.5:

Таблиця 4.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 48 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	63	3,024	А	38,9
Соєве борошно	50	2,4		
Кукурудзяне борошно	10	0,480		
Рибне борошно	10	0,480		
Порошок шовкопряда	6	0,288		
Вода		32,2 л		
CaCO ₃	7	0,336	Б	1,7
Вода		1,34 л		
NH ₄ Cl	12,2	0,586	В	5,7
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,25	0,012		
Вода		5,7 л		
Соєва олія	35	1,680	-	1,7
			Всього:	48 л

4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

для виробничого біосинтезу

Для цієї стадії необхідно 480 л поживного середовища (див. табл. 2.1), а поділ композицій для стадії виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³, здійснюється аналогічно попередній стадії.

Композиція А: глюкоза, соєве борошно, рибне борошно, кукурудзяне борошно, порошок шовкопряда (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: NH₄Cl, CaCl₂ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для стадії виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³ наведений у табл. 4.6:

Таблиця 4.6

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 480 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	63	30,24	А	389
Соєве борошно	50	24		
Кукурудзяне борошно	10	4,8		
Рибне борошно	10	4,8		
Порошок шовкопряда	6	2,88		
Вода		322 л		
CaCO ₃	7	3,36	Б	16,8
Вода		13,4 л		
NH ₄ Cl	12,2	5,9	В	57,4
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,25	0,12		
Вода		57,4 л		
Соєва олія	35	16,8	-	16,8
			Всього:	480 л

4.5. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у

процесі біосинтезу тобраміцину

Підтримання стабільного рН є критично важливим для ефективного росту та продуктивності нашого продуцента, оскільки оптимальне значення під час культивування становить 7,0 [10]. У процесі біосинтезу тобраміцину в культуральному середовищі накопичуються проміжні метаболіти, що можуть зміщувати рН як у кислу, так і в лужну сторону. Такі коливання негативно впливають на фізіологічний стан клітин і можуть знижувати вихід антибіотика. Для запобігання цьому в технологічній схемі передбачено використання титрувальних агентів – 15%-го розчину соляної кислоти для корекції лужних зсувів і 15%-го розчину гідроксиду натрію для нейтралізації кислотних змін. Середня потреба у реагентах становить близько 2 мл на 1 л поживного середовища, що забезпечує підтримання рН на оптимальному рівні протягом усього процесу культивування.

Для визначення способу приготування допоміжних розчинів (HCl та NaOH) були проведені відповідні розрахунки, результати яких наведено у таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних агентів

Об'єм середовища, л	HCl (15%)		NaOH (15%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,6	-	-	-	-
4,8	9,6	у колбі на 2 л	9,6	у колбі на 250 мл
48	96		96	
480	960		960	у колбі на 2 л

4.6. Обґрунтування вибору піногасника

У складі поживного середовища присутній карбонат кальцію (CaCO_3) і різні види борошна, які у процесі культивування можуть сприяти інтенсивному піноутворенню через виділення CO_2 та механічне перемішування середовища. Утворення піни негативно впливає на ефективність переносу кисню та

ускладнює контроль процесу, тому у технологічній схемі необхідно передбачити заходи для запобігання цьому явищу.

Варто зазначити, що до складу середовища вже входить соєва олія, яка здатна частково виконувати функцію природного піногасника. Рослинні олії добре зарекомендували себе як екологічно безпечні засоби пригнічення піни, оскільки вони швидко розкладаються мікроорганізмами та можуть слугувати додатковим джерелом вуглецю й факторів росту [28]. Проте через наявність білкових компонентів (соєве, рибне та кукурудзяне борошно, порошок шовкопряда) та CaCO_3 , піноутворення може залишатися інтенсивним, і однієї лише соєвої олії може бути недостатньо.

Фізичні методи (зміна швидкості перемішування чи підвищення тиску у ферментері) здатні зменшити утворення піни, однак вони мають обмеження. У таких випадках доцільним є застосування механічних піногасників [28].

Отже, технологічна схема виробництва тобраміцину включає **такі додаткові стадії:**

- 1) підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- 2) приготування 6% розчину HCl для підтримання рН на рівні 7,0 упродовж вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л;
- 3) приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для підтримання рН на рівні 7,0 упродовж вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л;
- 4) приготування 15% розчину HCl для підтримання рН на рівні 7,0 упродовж виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³;
- 5) приготування та стерилізація 15% розчину NaOH для підтримання рН на рівні 7,0 упродовж виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³;
- 6) зберігання соєвої олії.

Крім того, необхідно **передбачити таке обладнання:**

- В цеху підготовки посівного матеріалу:

– реактори-змішувачі для заварювання борошна об'ємом 5 л та 50 л для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 л та 100 л відповідно;

– реактори-змішувачі об'ємом 5 л та 50 л для приготування та стерилізації композиції А для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 л та 100 л відповідно;

– реактори-змішувачі об'ємом 10 л та 50 л для приготування та стерилізації композиції В для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 л та 100 л відповідно;

– реактор-змішувач об'ємом 5 л для приготування та стерилізації композиції Б для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л.

➤ В цеху виробничого біосинтезу:

– реактор-змішувач для заварювання борошна об'ємом 500 л для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³;

– реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А об'ємом 500 л для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³;

– реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б об'ємом 30 л для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³;

– реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції В об'ємом 500 л для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³.

РОЗДІЛ 5

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу тобраміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
З-1	Збірник для зберігання соєвої олії	1	Збірник об'ємом 20 л. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Китай https://www.alibaba.com/product-detail/DZJX-20l-50-Liter-30m3-200l_1601276714485.html?spm=a2700.7724857.0.0.5c2e26a9yRogR0
Р-2	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор об'ємом 10 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-500 об/хв; діапазон температур: -80-350 °С; потужність двигуна мішалки: 3 кВт; габаритні розміри: 480x480x1560. Виробник: Valuen (Китай) https://www.valuenindustrial.com/10L-Jacketed-Stainless-Steel-Reactor-pd592733178.html
Р-3	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор об'ємом 5 л. Матеріал: бросилікатне скло; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; діапазон температур: -120-260 °С; потужність двигуна мішалки: 0,12 кВт; габаритні розміри: 450x480x1500. Виробник: Китай https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Давидчук В.О.			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							46	5
Керівник		Лич І.В.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.						46		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

I-4	Інокулятор	1	<p>Інокулятор BR500-M1 об'ємом 10 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 50-1000 об/хв; діапазон температур: 0-120 °С; датчики: температури, рН, піни, розчиненого кисню; габаритні розміри: 800x800x1800.</p> <p>Виробник: Bioreactors.net Ltd (Латвія) https://eshop.lab1st.com/products/10l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-and-cell-culture-br500-m1?srltid=AfmBOoqrvVik7MFmX3IcTQxyT-cJ8r9DDqYFBU78qCWzcrWd6Eg-CYHW</p>
P-5	Реактор-змішувач для заварювання борошна	1	<p>Реактор об'ємом 30 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; діапазон температур: 0-260 °С; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри:</p> <p>Виробник: Китай https://www.zzelab.com/Stainless_Steel_Reactor/271.html</p>
P-6	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	<p>Реактор об'ємом 100 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-450 об/хв; діапазон температур: -10-70 °С; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 910x730x2030.</p> <p>Виробник: Across International (США) https://www.acrossinternational.com/ai-dual-jacketed-100l-316l-grade-stainless-steel-reactor-with-filter.html?srltid=AfmBOookekb2YhawRdXkqd_8lCeFOctxX2Dr5foEfn5vy2I5ibFQDfq</p>
H-7	Насос перистальтичний для перекачування композиції А з P-6 до I-9	1	<p>Перистальтичний насос MP-1136-22. Матеріал корпусу: чавун з антикорозійною обробкою; потужність: 0,55 кВт; висота подачі: 80 м; максимальна продуктивність: 630 л/год (10,5 л/хв).</p> <p>Виробник: Debem (Італія) https://etatronds.com.ua/ua/p2635475666-peristalticheskij-nasos-1136.html?source=merchant_center&gad_source=1&gad_campaignid=20147497402&gbraid=0AAAAAouA26Mc0ZwWNiduxbxABDShWUzNc&gclid=CjwKCAiAlfvIBhA6EiwAcErpyVSFh4F-</p>

			fLStlCCKrPkV8hQcF78aS86S2_rvJuFg7fGhS a3svuMyXhoCiHcQAvD_BwE
P-8	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор об'ємом 10 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-500 об/хв; діапазон температур: -80-350 °С; потужність двигуна мішалки: 3 кВт; габаритні розміри: 480x480x1560. Виробник: Valuen (Китай) https://www.valuenindustrial.com/10L-Jacketed-Stainless-Steel-Reactor-pd592733178.html
I-9	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-SJA об'ємом 100 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 50 - 1000 об/хв; аерація: 1-2 л/хв; датчики: температури, рН, рО ₂ , піни, габаритні розміри: 600×900×1600. Виробник: Bailun Biotechnology Co., Ltd (Китай) https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/UEPYHRxKVWVk/China-100-Liter-Stainless-Microbial-Fermenters-and-Bioreactors-Fermentation-Tank.html
P-10	Реактор-змішувач для заварювання борошна	1	Реактор об'ємом 50 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-500 об/хв; діапазон температур: -80-350 °С; потужність двигуна мішалки: 6 кВт; габаритні розміри: 394x762. Виробник: Valuen (Китай) https://www.valuenindustrial.com/10L-Jacketed-Stainless-Steel-Reactor-pd592733178.html
P-11	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор об'ємом 1000 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-100 об/хв; діапазон температур: -10-250 °С; потужність двигуна мішалки: 1,5 кВт; габаритні розміри: 1900x1500x1500. Виробник: Китай https://www.alibaba.com/product-detail/100L-1000L-Dual-Jacketed-Electric-Stainless_60717692164.html
H-12	Насос відцентровий для перекачування композиції А з Р-11 до ФР-16	1	Відцентровий насос з магнітною муфтою DM 06. Матеріал корпусу: чавун з антикорозійною обробкою; потужність: 0,37 кВт; висота подачі: 8,5

			<p>м; максимальна продуктивність: 6 м³/год (100 л/хв).</p> <p>Виробник: Debem (Італія)</p> <p>https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm06/</p>
P-13	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Реактор об'ємом 30 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-460 об/хв; діапазон температур: 0-260 °С; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри:</p> <p>Виробник: Китай</p> <p>https://www.zzelab.com/Stainless_Steel_Reactor/271.html</p>
P-14	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	<p>Реактор об'ємом 100 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-450 об/хв; діапазон температур: -10-70 °С; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 910x730x2030.</p> <p>Виробник: Across International (США)</p> <p>https://www.acrossinternational.com/ai-dual-jacketed-100l-316l-grade-stainless-steel-reactor-with-filter.html?srsId=AfmBOookekb2YhawR_dXkqd_8lCeFOctxX2Dr5foEfn5vy2I5ibF_QDfq</p>
H-15	Насос перистальтичний для перекачування композиції В з P-14 до ФР-16	1	<p>Перистальтичний насос MP-1136-22.</p> <p>Матеріал корпусу: чавун з антикорозійною обробкою; потужність: 0,55 кВт; висота подачі: 80 м; максимальна продуктивність: 630 л/год (10,5 л/хв).</p> <p>Виробник: Debem (Італія)</p> <p>https://etatronds.com.ua/ua/p2635475666-peristalticheskij-nasos-1136.html?source=merchant_center&gad_source=1&gad_campaignid=20147497402&gbraid=0AAAAAouA26Mc0ZwWNiduxbxABDShWUzNc&gclid=CjwKCAiAlfvIBhA6EiwAcErpyVSFh4F-fLStlCCKrPkV8hQcF78aS86S2_rvJuFg7fGhSa3svuMyXhoCiHcQAvD_BwE</p>
ФР-16	Ферментер	1	<p>Ферментер BR500-M1 об'ємом 1000 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 50 - 1000 об/хв; аерація: 2 л/хв;</p> <p>датчики: температури, рН, рО₂, піни, габаритні розміри: 1200×1200×2830.</p> <p>Виробник: Bioreactors.net Ltd (Латвія)</p>

			https://eshop.lab1st.com/products/10001-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-and-cell-culture-br500-c1?srsltid=AfmBOoqg2IaxTVieelyiAN_szpBSrLWeawploOM0ZRmD-rJa6DuIIY7
--	--	--	---

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ТОБРАМІЦИНУ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітрязабірного пристрою у найвищій точці – на висоті 18 м (див. підрозділ 2.1).

ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток

Очищення повітря від грубих часток (від ДР 1.1) проводять у фільтрі попереднього очищення, що забезпечує ступінь очищення до 90%. Даний етап дає можливість знизити рівень контамінації повітря за рахунок затримання деякої кількості мікроорганізмів із часточками пилу.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря (від ДР 1.2) здійснюють у компресорі до 0,35-0,5 МПа. Стиснення повітря призводить до підвищення його температури до 120-200°C, а також до збільшення вологовмісту на одиницю об'єму.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача, де охолоджується до температури 25-40°C за допомогою охолодженої води як теплоносія. Потім зайву вологу видаляють за допомогою ресивера. Показник вологості зменшується до 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача, де нагрівається до температури 45-50°C за допомогою пари низького тиску. Показник вологості при цьому зменшується до 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки, який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Давидчук В.О.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							51	10
Керівник		Лич І.В.				Кафедра БТМ 51		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

складає 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через подається в індивідуальні фільтри кожного з біореакторів до ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 4.7, ТП 5.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999%.

ДР 2. Підготовка титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування титрувального розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л

Для приготування 105,6 мл 6% розчину HCl слід за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл відміряти 91,2 мл дистильованої води й влити її в колбу об'ємом 250 мл. Потім додати 14,4 мл 37% соляної кислоти та ретельно перемішати розчин.

2.1.2. Приготування 15%-го розчину HCl для підкислення середовища у ферментері на 1 м³

Для приготування 960 мл 15% розчину HCl слід за допомогою мірного циліндра об'ємом 1 л відміряти 571 мл дистильованої води й влити її в колбу об'ємом 2 л. Потім додати 389 мл 37% соляної кислоти та ретельно перемішати розчин.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація титрувального розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л.

Для приготування 105,6 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 6,34 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 250 мл і за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл додають 99,3 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 15%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 1 м³.

Для приготування 960 мл 15%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 144 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л і за допомогою мірного циліндру об'ємом 1 л додають 816 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення. Стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Підготовка соєвої олії

ДР 3.1. Зберігання соєвої олії

Соєва олія як компонент не вимагає стерилізації. Її зберігають у герметичному заводському резервуарі на складі (до подальшого використання). При необхідності, соєву олію переливають у виробничий збірник (З-1) об'ємом 20 л.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

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

ДР 4.1.1. Розварювання борошна

На технічних вагах зважують 30 г соєвого борошна та 6 г кукурудзяного борошна. Отримані наважки соєвого та кукурудзяного борошна переносять у колбу об'ємом 500 мл. Далі додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду об'ємом 144 мл, для суспендування, після чого суміш поступово нагрівають на водяній бані до температури 70–90 °С і витримують у цьому температурному діапазоні 20–30 хвилин.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 37,8 г глюкози, 6 г рибного борошна та 3,6 г порошку шовкопряда. Отримані наважки переносять в колбу об'ємом 1 л та додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 250 мл дистильовану воду об'ємом 223 мл, 180 мл розвареного борошна (від ДР 4.1.1) і перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 4,2 г CaCO_3 . Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 50 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 50 мл дистильовану воду об'ємом 17 мл та суспендують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 7,32 г NH_4Cl та 0,15 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 750 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл дистильовану воду об'ємом 283 мл, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 10 л

Для інокулятора об'ємом 10 л необхідно приготувати 4,8 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 600 мл.

ДР 4.2.1. Розварювання борошна

На технічних вагах зважують 240 г соєвого борошна та 48 г кукурудзяного борошна. Отримані наважки соєвого та кукурудзяного борошна переносять у колбу об'ємом 3 л. Далі додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду об'ємом 1152 мл, для суспендування, після чого суміш поступово нагрівають на водяній бані до температури 70–90 °С і витримують у цьому температурному діапазоні 20–30 хвилин.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 340,2 г глюкози, 48 г рибного борошна та 22,8 г порошку шовкопряда. Наважки переносять до реактора (Р-2) об'ємом 10 л та додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 2050 мл, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Потім до реактора подають 1440 мл

розвареного борошно (від ДР 4.2.1) та перемішують. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 33,6 г CaCO₃. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду об'ємом 134 мл та суспендують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2.4. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 58,56 г NH₄Cl та 1,2 г CaCl₂×2H₂O. Отримані наважки переносять у реактор (Р-3) об'ємом 5 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 570 мл, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Одержану композицію подають в інокулятор (І-4) об'ємом 10 л та стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

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

Для інокулятора об'ємом 100 л необхідно приготувати 48 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 6 л та конденсат (10%).

ДР 4.3.1. Розварювання борошна

На технічних вагах зважують 2400 г соєвого борошна та 480 г кукурудзяного борошна. Отримані наважки соєвого та кукурудзяного борошна переносять у реактор (Р-5) об'ємом 30 л. Далі за допомогою лічильника додають питну воду об'ємом 11,52 л, для суспендування, потім поступово нагрівають вміст реактора до температури 70-90 °С подачею пари у сорочку апарату і, витримують при такій температурі упродовж 20-30 хв, проводять розварювання, постійно перемішуючи. Після розварювання борошно самоплином подають до реактора (Р-6) для приготування композиції А.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 3024 г глюкози, 480 г рибного борошна та 288 г порошку шовкопряда. Отримані наважки переносять у реактор (P-6) об'ємом 100 л та додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 20,68 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Потім до реактора самоплином подають 14,4 л розвареного борошна (від ДР 4.3.1) та перемішують. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 336 г CaCO₃. Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 2 л, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 150 мл дистильовану воду об'ємом 1,34 л та суспендують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.3.4. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 585,6 г NH₄Cl та 12 г CaCl₂×2H₂O. Отримані наважки переносять у реактор (P-8) об'ємом 10 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 5,7 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Одержану композицію самоплином подають в інокулятор (I-9) об'ємом 100 л та стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³, необхідно приготувати 480 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 60 л та конденсат (10%).

ДР 4.4.1. Розварювання борошна

Через ваговий дозатор у реактор (P-10) об'ємом 50 л завантажують 24 кг соєвого борошна та 4,8 кг кукурудзяного борошна. Далі за допомогою

лічильника додають питну воду об'ємом 115,2 л, для суспендування, потім поступово нагрівають вміст реактора до температури 70-90 °С подачею пари у сорочку апарату і, витримують при такій температурі упродовж 20-30 хв, проводять розварювання, постійно перемішуючи. Після розварювання борошно самоплином подають до реактора (**Р-1**) для приготування композиції А.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор у реактор (**Р-11**) об'ємом 1000 л завантажують 30,24 кг глюкози, 4,8 кг рибного борошна та 2,88 кг порошку шовкопряда та додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 206,8 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Потім до реактора самоплином подають 144 л розвареного борошна (від ДР 4.4.1) та перемішують. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3,36 кг CaCO₃. Отриману наважку переносять у реактор (**Р-13**) об'ємом 30 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 13,4 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Стерилізують композицію безпосередньо у реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.4.4. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 5856 г NH₄Cl та 120 г CaCl₂×2H₂O. Отримані наважки переносять у реактор (**Р-14**) об'ємом 100 л, додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 57 л, у сорочку реактора подають пару до досягнення 40 °С, перемішують за допомогою мішалки (100 об/хв) до повного розчинення. Одержану композицію за допомогою насоса (**Н-15**) перекачують у ферментер (**Ф-16**) об'ємом 1 м³ та стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp^{*}-tobO підтримують на агаризованому середовищі MS [7]. Кожні 2-3 місяці проводять пересіви на свіжоприготоване середовище. Під час робіт із такою колекційною культурою дотримуються правил асептики.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp^{*}-tobO (від ТП 5.1) методом виснажувального штриха пересівають на чашки Петрі з агаризованим середовищем MS для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при $t = 37 \pm 1$ °C (48 год).

ТП 5.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Із чашок Петрі одержані ізольовані колонії продуцента від (ТП 5.2) пересівають за допомогою петлі у пробірки зі скошеним середовищем MS (для засіву 1 пробірки використовують 1 ізольовану колонію). Культивування проводять при 37 ± 1 °C протягом 48 год.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 2 л з стерильною композицією А (від ДР 4.1.2) вносять композиції Б та В (від ДР 4.1.3 та ДР 4.1.4) та соєву олію (від ДР 3.1), перемішують і розливають за допомогою стерильного циліндра на 250 мл по 150 мл у 4 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp^{*}-tobO (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (200 об/хв) при температурі 37 ± 1 °C упродовж 72 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 2 л.

ТП 5.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор з композицією В (від ДР 4.2.4) подають композицію А (від ДР 4.2.2) та композицію Б (від ДР 4.2.3) та соєву олію (від ДР 3.1), вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 5.4). Культивують при температурі 37 ± 1 °С, подачі стерильного повітря і швидкості перемішування 220 об/хв упродовж 72 год, рівень рН, за потреби, регулюють 6%-им розчином НСІ (від ДР 2.1.1) та 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) до 6,8-7,0.

Кожні 8 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси, яка на кінець культивування становить 16 г/л.

ТП 5.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокулятор з композицією В (від ДР 4.3.4) подають композицію А (від ДР 4.3.2) та композицію Б (від ДР 4.3.3) та соєву олію (від ДР 3.1), вмикають перемішуючий пристрій. Самоплином з інокулятора 10 л вносять посівний матеріал (від ТП 5.5). Культивують при температурі 37 ± 1 °С, подачі стерильного повітря і швидкості перемішування 220 об/хв упродовж 72 год, рівень рН, за потреби, регулюють 6%-им розчином НСІ (від ДР 2.1.1) та 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) до 6,8-7,0.

Кожні 8 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси, яка на кінець культивування становить 16 г/л.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³

У ферментер з композицією В (від ДР 4.4.4) вносять композицію А (від ДР 4.4.2) та композицію Б (від ДР 4.4.3) та соєву олію (від ДР 3.1), вмикають перемішуючий пристрій. Самоплином з інокулятора 100 л вносять посівний матеріал (від ТП 5.6). Культивують при температурі 37 ± 1 °С, подачі стерильного повітря і швидкості перемішування 220 об/хв упродовж 144 год, рівень рН, за потреби, регулюють 15%-им розчином НСІ (від ДР 2.1.2) та 15%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.2) до 6,8-7,0.

Кожні 8 год та по завершенню біосинтезу із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси і тобраміцину, які на кінець процесу становлять 32 г/л і 4 г/л відповідно.

РОЗДІЛ 7

ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТОБРАМІЦИНУ

7.1. Обґрунтування етапу виділення тобраміцину

Після завершення ферментації культуральний бульйон містить комплекс аміноглікозидів, до яких входять проміжні сполуки (6''-О-карбамоїлтобраміцин), супутні аміноглікози, білкові домішки, полісахариди та біомаса продуцента *Streptomyces tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEp*-tobO. Для забезпечення ефективного подальшого очищення критично важливо видалити твердий компонент і знизити рівень домішок перед селективними стадіями, що дозволяє отримувати продукт з високою фармакопейною чистотою та зменшити навантаження на сорбційні й хроматографічні системи [10].

7.1.1. Виділення біомаси з культуральної рідини після здійснення біосинтезу

На першому етапі обробки культуральний бульйон піддають попередньому розділенню твердих частинок і рідкої фази. Це досягається або центрифугуванням, або фільтрацією (часто із застосуванням мембранних технологій).

Центрифугування — це механічний метод, який за рахунок відцентрової сили ефективно відокремлює міцелій та клітинну біомасу від розчину, що дозволяє видаляти значну частину твердих фракцій за короткий час. Однак центрифугування є енерговитратним і може вимагати спеціальних промислових сепараторів при обробці великих об'ємів ферментаційної рідини [29].

Мембранні методи (мікрофільтрація та ультрафільтрація) забезпечують більш м'який контакт із рідиною та здатні інтегруватися у безперервні технологічні лінії, але потребують періодичного контролю забруднення мембран

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Давидчук В.О.			РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТОБРАМІЦИНУ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>							61	4
<i>Керівник</i>		Лич І.В.				Кафедра БТМ 61		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

та промивки. Ультрафільтрація додатково видаляє високомолекулярні домішки, що полегшує наступні сорбційні стадії [30].

Для відділення біомаси від культуральної рідини в процесі отримання тобраміцину найбільш доцільним є застосування центрифугування. Цей метод дозволяє швидко та ефективно відокремити міцелій і клітинні залишки від рідкої фази, що містить екзоклітинний продукт, без втрат і деградації активного антибіотика. Використання центрифугування забезпечує отримання освітленого культурального бульйону, готового до наступних етапів селективної сорбційної екстракції та очищення, а також зменшує навантаження на сорбційні й хроматографічні системи.

7.1.2. Обґрунтування етапу екстракції тобраміцину

Після видалення твердих домішок отриманий освітлений культуральний бульйон містить тобраміцин у складі складного комплексу аміноглікозидів, до якого входять також проміжні сполуки, зокрема 6"-О-карбамоїлтобраміцин, та побічні продукти метаболізму. Для ефективного і селективного виділення цільового продукту необхідно перевести його у форму, придатну для взаємодії з катіонообмінними носіями.

У сучасних технологіях очищення аміноглікозидних антибіотиків цей етап реалізується через сорбційну екстракцію. Освітлений бульйон пропускають через колонку, заповнену катіонообмінною смолою — слабкою або сильною, наприклад Amberlite IRC 50, у формі амонію, яка селективно адсорбує позитивно заряджені молекули тобраміцину, водночас пропускаючи нейтральні та кислотні домішки. Це дозволяє концентрувати антибіотик і зменшувати об'єм розчину перед наступними стадіями очищення [31].

Елюювання антибіотичних фракцій здійснюють за рахунок зміни іонної сили розчину, наприклад градієнтним введенням амонійного буферу або солей. В результаті формуються концентровані фракції, збагачені цільовим продуктом, які вже готові до подальшого лужного гідролізу проміжних сполук та іонообмінної хроматографії. Такий підхід дозволяє максимально зберегти

фармакологічну активність молекули, мінімізувати втрати продукту та підвищити чистоту кінцевого препарату [31, 32].

7.2. Обґрунтування етапу очищення тобраміцину

На стадії очищення після первинної сорбції та концентрування розчину необхідно досягти фармакопейної чистоти тобраміцину. У супернатанті залишаються супутні домішки, включно з канаміцином В, неамінами та іншими структурно подібними аміноглікозидами, тому застосовують селективні технології очистки, що базуються на електростатичних взаємодіях та різниці в розчинності. Одним із ключових методів є іонообмінна хроматографія, під час якої позитивно заряджені молекули антибіотика адсорбуються на катіонних іонообмінних носіях у контрольованих умовах рН та іонної сили, а домішки вимиваються водою або слабкими буферами. Використання високоефективної рідинної хроматографії (HPLC IPAD) дозволяє контролювати склад домішок на різних стадіях виробництва та оцінювати ефективність очищення антибіотичної субстанції [33].

Розчин після первинної сорбції містить 6"-О-карбамоїлтобраміцин, проміжний продукт, що не має терапевтичної активності, але є безпосереднім попередником активного тобраміцину. Для отримання фармакологічно активної молекули ці фракції піддають лужному гідролізу: рН розчину підвищують до 11–12 шляхом додавання гідроксиду натрію або концентрованого гідроксиду амонію, після чого розчин нагрівають до 90–100 °С протягом 1–2 годин. Це дозволяє відщепити карбамоїльну групу та сформувати активну молекулу тобраміцину. Перебіг реакції контролюють аналітичними методами, такими як тонкошарова хроматографія або високоефективна рідинна хроматографія, щоб забезпечити повне перетворення та мінімізувати побічні продукти [33, 34].

Після гідролізу розчин, що містить активну форму тобраміцину, піддають додатковому очищенню, яке включає повторні етапи іонообмінної хроматографії або інші селективні адсорбційні методи для досягнення фармакопейної чистоти. Згодом застосовують кристалізацію, наприклад із водно-спиртових систем

(метанол або етанол) при контрольованому охолодженні чи зміні складу розчинника. Це дозволяє виділити тобраміцин сульфат у вигляді стабільних кристалів високої чистоти, готових для фармацевтичного використання [35].

Завдяки поєднанню селективних фізико-хімічних стадій — від сорбційної екстракції та іонообмінної хроматографії до лужного гідролізу та кристалізації — промислова схема виділення та очищення тобраміцину є ефективною, технологічно обґрунтованою та придатною для масштабного виробництва із високою вихідною чистотою, що відповідає сучасним стандартам якості.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ТОБРАМІЦИНУ

8.1. Мікробіологічний контроль

Для біотехнологічного одержання антибіотика тобраміцину актиноміцетом *S. tenebrarius* Tb- Δ aprJ- Δ tobR/ermEr*-tobO проводять суворий мікробіологічний моніторинг: кожні 8 год із інокуляторів і виробничого ферментера відбирають зразки бульйону. Їх вивчають під мікроскопом та сіють на тверді середовища. МПА застосовують для виявлення бактеріального забруднення, а ГКА чи СА – щоб виявити сторонні дріжджі та плісняві гриби. Подібна схема контролю дає змогу зберегти стерильність усієї лінії.

8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища

Перевірка стерильності середовищ

Відібрану пробу поживного середовища або культуральної рідини наносять стерильною петлею на агар, розсіюючи методом виснажувального штриха. Чашки інкубують три доби при 37 ± 2 °C на м'ясо-пептонному або глюкозо-картопляному агарі для виявлення бактеріальної контамінації, а на сусло-агарі — при 24–26 °C для контролю грибів і дріжджів [36]. Після інкубації оцінюють наявність колоній у зоні штриха: за умови дотримання асептики ріст відсутній, що підтверджує стерильність зразка.

Перевірка мікробіологічної чистоти біологічного агента

Колонії *Streptoalloteichus tenebrarius* на агарі Чапека з пептоном характеризуються повітряним білим або кремовим міцелієм, добре вираженим аерейним ростом та рясним спороутворенням. Краї колоній рівні або трохи хвилясті, поверхня суха, з характерним «пухнастим» виглядом через спори. Міцелій легко відділяється від поверхні агарового середовища [37] (рис. 8.1).

					НУХТ БТЕК 05.01.29 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Давидчук В.О.			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ТОБРАМІЦИНУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							65	5
Керівник		Лич І.В.				Кафедра БТМ 65		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						



Рис. 8.1. Колонії *Streptomyces tenebrarius* на агарі Чапека

8.1.2. Мікроскопіювання

Для проведення мікроскопічного дослідження культуральної рідини готують мазок, дотримуючись асептичних умов. Спершу беруть чисте та попередньо знежирене предметне скло. За допомогою стерильної бактеріальної петлі або піпетки обережно відбирають краплю культуральної рідини та наносять її на центр скельця. Далі краплю рівномірно розподіляють по поверхні скла, формуючи тонкий мазок діаметром приблизно 1 см. Отриманий препарат залишають при кімнатній температурі до повного висихання — нагрівання при цьому не застосовується, аби уникнути деформації клітин.

Після висихання на мазок за допомогою скляної палички або крапельниці наносять одну-дві краплі імерсійного масла, яке забезпечує чітке зображення під час спостереження. Препарат розглядають у світловому мікроскопі з використанням імерсійного об'єктива (зазвичай $\times 100$), що дозволяє виявити мікроскопічні ознаки можливої контамінації.

Після завершення мікроскопії надлишок імерсійного масла ретельно видаляють з об'єктива ватним тампоном або серветкою, змоченою 96% етиловим

спиртом, щоб зберегти чистоту та прозорість оптики для подальшого використання [38].

Під мікроскопом клітини *Streptoalloteichus tenebrarius* мають вигляд грампозитивних паличок із характерним розгалуженням гіф. Спостерігаються спороносні структури у формі спіральних ланцюжків спор (рис. 8.2). Клітини немобільні, а їхні розміри становлять приблизно $0,75 \times 1,25$ мкм [23].

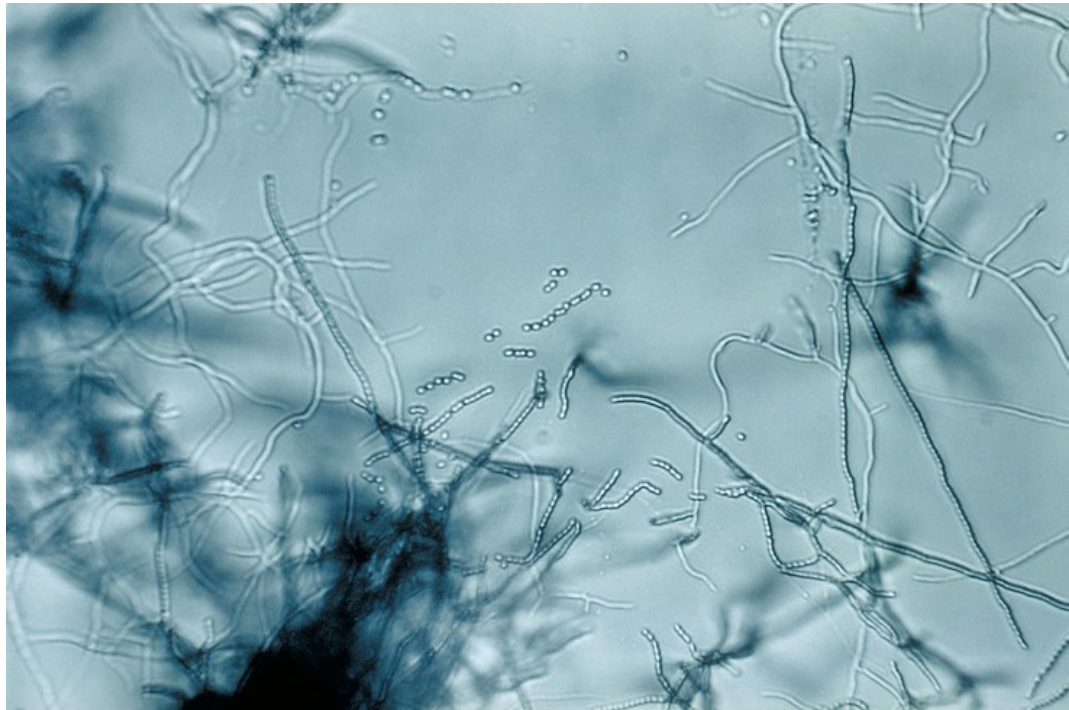


Рис. 8.2. Мікроскопічне зображення *Streptomyces tenebrarius* (збільшення $\times 1000$)

8.2. Технологічний контроль

8.2.1. Визначення концентрації біомаси *Streptomyces tenebrarius* Тб- $\Delta aprJ-\Delta tobR/ermE^*-tobO$

Пробу культуральної рідини відбирають у стерильних умовах, через стерильний відбірник. Перед аналізом пробу фільтрують або центрифугують для видалення клітин.

Пробу культурального бульйону фільтрують через попередньо висушений фільтр з розміром пор 45 мкм (Supor-450; Pall Corporation). Фільтрат збирають та використовують для аналізу метаболітів за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та для аналізу антибіотиків. Біомасу на фільтрі двічі промивають дистильованою водою; потім фільтр з біомасою сушать в

мікрохвильовій печі при потужності 170 Вт протягом 20 хвилин та охолоджують в ексікаторі протягом 15 хвилин, після чого вимірюють приріст маси [10].

8.2.2. Визначення концентрації тобраміцину

Пробу культуральної рідини відбирають у стерильних умовах, через стерильний відбірник. Для аналізу попередника тобраміцину – карбамоїлтобраміцину, зразки культури після ферментації центрифугують при $10000\times g$ протягом 5 хвилин для видалення міцелію; супернатанти дериватизують 2% 2,4-динітрофторбензолом та фільтрують через мембрану Millipore (діаметр пор 0,22 мкм).

Концентрацію карбамаїлтобраміцину, аналізують на системі ВЕРХ Waters (Milford), оснащій колонкою WISP 717 та флуоресцентним детектором (Waters 474), який встановлюють на 338 нм для збудження та 418 нм для вимірювання емісії. Загальний потік елюенту становить $1,2 \text{ мл}\cdot\text{хв}^{-1}$. Один літр розчину елюенту містить 175 мл метанолу, 3,2 г гексансульфонату натрію, 12,8 г сульфату натрію, від 0,8 до 1,2 г оцтової кислоти (для досягнення рН 3,4) та воду Milli-Q (система очищення надчистої води Milli-Q; Millipore). Елюент В відрізняється від елюенту А тим, що містить вдвічі більшу кількість метанолу. Антибіотик дериватизують о-фталевим альдегідом та меркаптаном з отриманням флуоресцентних сполук. Дериватизація проводиться за кімнатної температури з реакційною спіраллю, встановленою після роздільної колони [10].

8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону у середовищі

Джерелом вуглецю в поживному середовищі є глюкоза та соєва олія.

Пробу культуральної рідини відбирають у стерильних умовах, через стерильний відбірник. Для аналізу зразка культуральної рідини після ферментації центрифугують при $10000\times g$ протягом 5 хвилин для видалення міцелію; супернатанти дериватизують 2% 2,4-динітрофторбензолом та фільтрують через мембрану Millipore (діаметр пор 0,22 мкм).

Глюкозу та позаклітинні метаболіти аналізують за допомогою ВЕРХ на колонці Aminex HPL-87H (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Каліфорнія) при 60°C. Рухома фаза - 5 мМ Н₂SO₄ зі швидкістю потоку 0,6 мл·хв⁻¹. Глюкозу кількісно визначають за допомогою диференціального рефрактометра (Waters 410; Millipore, Бедфорд, Массачусетс), тоді як ацетат та піруват кількісно визначають за допомогою налаштованого детектора абсорбції, встановленого на 210 нм (Waters 486; Millipore, Бедфорд, Массачусетс) [10].

8.2.4. Визначення концентрації джерела Нітрогену у середовищі

Джерелом амонійного азоту в середовищі є хлорид амонію. Концентрацію амонію в культуральному бульйоні визначали за допомогою аміачного електрода (Orion Research, Бостон, Массачусетс, США) з хлоридом амонію як стандартом [39].

Джерелом органічного азоту в поживному середовищі є соєве, кукурудзяне і рибне борошно та порошок шовкопряда. У складі цих компонентів міститься значна кількість білків, пептидів та вільних амінокислот, які забезпечують мікроорганізми доступним джерелом азоту, необхідного для синтезу тобраміцину. Вміст амінного азоту у ферментаційному бульйоні визначали методом формольного титрування.

Для проведення аналізу беруть аліквоту культурального супернатанту об'ємом 20 мл і переносять у чисту конічну колбу. Додають 5 мл формальдегіду (НСНО) і витримують суміш протягом 2 хвилин. Потім додають кілька крапель індикатора фенолфталеїну та титрують розчин гідроксидом натрію (NaOH) до появи стійкого блідо-рожевого забарвлення. Титрування повторюють кілька разів для отримання узгоджених результатів, які виражають у міліграмах на мілілітр (мг/мл) [40].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Helmi, N. R. Exploring the diversity and antimicrobial potential of actinomycetes isolated from different environments in Saudi Arabia: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*. 2025, 16. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1568899>
2. Mast, Y., & Stegmann, E. Actinomycetes: The Antibiotics Producers. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2019, 8 (3): 105. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030105>
3. Rosalia, M., Chiesa, E., Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Conti, B., & Pisani, S. Tobramycin Nanoantibiotics and Their Advantages: A Minireview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23 (22): 14080. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms232214080>
4. Neu, H. C. (1976). Tobramycin: an overview. *The Journal of infectious diseases*, P. 3-19.
5. Thompson, R. Q., Presti, E. A. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. III. Isolation and chemical-physical properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1967:332-340, 1968.
6. Reyes, M. P., Zhao, J. J., & Buensalido, J. A. L. Current perspectives: therapeutic uses of tobramycin. *J. Pharmacovigil.* 2014, 2: 1000123.
7. R. N. Brogden, R. M. Pinder, Phyllis R. Sawyer, T. M. Speight, G. S. Avery. Tobramycin: A Review of its Antibacterial and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use. *Drugs*. 1976, 12 (3): 166–200. doi:10.2165/00003495-197612030-00002
8. Reyhanoglu G, Reddivari AKR. Tobramycin. [Updated 2023 Aug 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551695/>
9. Xiao, J., Li, H., Wen, S., & Hong, W. Concentrated biosynthesis of tobramycin by genetically engineered *Streptomyces tenebrarius*. *The Journal of general and applied microbiology*. 2014, 60 (6): 256–261. doi: <https://doi.org/10.2323/jgam.60.256>

10. Feng, Yun & Jiang, Yiqi & Chen, Xutong & Zhu, Li & Xue, Hailong & Wu, Mianbin & Yang, Lirong & Yu, Haoran & Lin, Jianping. (2024). Improving the production of carbamoyltobramycin by an industrial *Streptoalloteichus tenebrarius* through metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 108. 10.1007/s00253-024-13141-2 .
11. Borodina, I., Schöller, C., Eliasson, A., & Nielsen, J. Metabolic Network Analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces Species* with an Active Entner-Doudoroff Pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71 (5): 2294–2302. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.71.5.2294-2302.2005>
12. Garg, R., Sabouni, R., & Ahmadipour, M. From waste to fuel: Challenging aspects in sustainable biodiesel production from lignocellulosic biomass feedstocks and role of metal organic framework as innovative heterogeneous catalysts. *Industrial Crops and Products*. 2023, 206: 117554. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117554>
13. Соєве борошно. Застосування соєвого борошна [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://soya.kiev.ua/ua/flour.html>
14. Mehta, N. K., Sharma, S., Tripathi, H. H., Satvik, K., Aruna, K., Choudhary, B. K., & Meena, D. K. Conversion of fish processing waste to value-added commodities: a waste to wealth strategies for greening of the environment. *Advances in Resting-state Functional MRI*. 2023. P. 421–466. doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-99145-2.00005-7>
15. Blasi, F., Carnovale, V., Cimino, G., Lucidi, V., Salvatore, D., Messori, B., Bartzaghi, M., Muscianisi, E., & Porpiglia, P. A. (2018). Treatment compliance in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection treated with tobramycin inhalation powder: The FREE study. *Respiratory Medicine*, 138, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.03.034>
16. Borisova, D., Strateva, T., Dimov, S. G., Atanassova, B., Paunova-Krasteva, T., Topouzova-Hristova, T., Danova, S. T., Tropcheva, R., & Stoitsova, S. (2025). Diversification of *Pseudomonas aeruginosa* After Inhaled Tobramycin Therapy of Cystic Fibrosis Patients: Genotypic and Phenotypic Characteristics of Paired Pre-

and Post-Treatment Isolates. *Microorganisms*, 13(4), 730. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13040730>

17. Blanchard, A. C., & Waters, V. J. (2022). Opportunistic Pathogens in Cystic Fibrosis: Epidemiology and Pathogenesis of Lung Infection. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 11(Supplement_2), S3—S12. <https://doi.org/10.1093/jpids/piac052>

18. Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 194–222. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002>

19. Муковісцидоз: жоден пацієнт не залишиться на самоті в часи війни [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://euneighbourseast.eu/uk/news/stories/mukovisczydoz-zhoden-pacziyent-ne-zalyshytsya-na-samoti-v-chasy-vijny/>

20. ТОБРАМІЦИН-ВІСТА [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/?\[43533\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[43533])

21. Тобраміцин-Фармекс краплі оч. 3 мг/мл по 5 мл №1 у флак. з криш.-крап. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%A2%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD-%D0%A4%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BA%D1%81/39240/>

22. Браксон розчин д/ін. 40 мг/мл по 2 мл №10 (5x2) в амп. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://tabletki.ua/uk/%D0%91%D1%80%D0%B0%D0%BA%D1%81%D0%BE%D0%BD/30249/#%D0%9F%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%B7%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F>

23. *Streptoalloteichus tenebrarius* A12253. 1 is a spore-forming, mesophilic, Gram-positive bacterium that produces antibiotic compounds and was isolated from soil [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/13493>

24. Mitousis, L., Maier, H., Martinovic, L., Kulik, A., Stockert, S., Wohlleben, W., Stiefel, A., & Musiol-Kroll, E. Engineering of *Streptoalloteichus tenebrarius* 2444 for Sustainable Production of Tobramycin. *Molecules*. 2021, 26 (14): 4343. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26144343>
25. NIENOW, A. Agitators for mycelial fermentations. *Trends in Biotechnology*. 1990, 8: 224–233. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90180-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90180-6)
26. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
27. Ezemba, Constance & Perpetua, Obi & Ezemba, Arinze & Affiliated, Steve. (2022). Media and Air Sterilization Required for Microbial Fermentation 1* [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.researchgate.net/publication/358265334_Media_and_Air_Sterilization_Required_for_Microbial_Fermentation_1
28. Li, D., Li, J., Wang, Y., Jiang, E., Zhao, W., Liu, G., & Yang, Z. (2025). A multi-attribute decision-making method of cascade reservoir joint scheduling schemes considering water–sediment, eco-environment, and socio-economy in the Yellow River Basin. *Journal of Hydrology*, 133393. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2025.133393>
29. Yatmaz, Ercan & Turhan, Irfan & Germeç, Mustafa & Karahalil, Ercan. (2017). Using centrifuge and ultrafiltration as downstream processes for the concentration of microbial β -mannanase fermentation media. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. 21. 133-136.
30. van Reis, R., & Zydney, A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 208–211. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00201-9](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00201-9)
31. Bulycheva, M. S., Sinitsyn, M. A., Iakhontova, L. F., Zhdanovich, I.uV., Nasonova, L. I., & Makarova, R. A. (1994). Sorbtsiia antibiotikov-aminoglikozidov iz nefil'trovannoï kul'tural'noï zhidkosti [Sorption of aminoglycoside antibiotics from

unfiltered culture fluid]. *Antibiotiki i khimioterapiia = Antibiotics and chemotherapy [sic]*, 39(4), 16–22.

32. Zhai, Z., Holmark, T., Jasperse, L., & Gargano, A. F. G. (2025). Developments in Ion Exchange Chromatography-Mass Spectrometry for the Characterization of Intact Proteins and Proteoforms. *Journal of separation science*, 48(9), e70268. <https://doi.org/10.1002/jssc.70268>

33. Hanko, V. P., Rohrer, J. S., Liu, H. H., Zheng, C., Zhang, S., Liu, X., & Tang, X. (2008). Identification of tobramycin impurities for quality control process monitoring using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 47(4-5), 828–833. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.002>

34. Li, B., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J., & Adams, E. (2009). Characterization of impurities in tobramycin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(18), 3941–3945. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.023>

35. BenchChem Technical Support Team. (2025). *The discovery and isolation of Tobramycin from Streptomyces tenebrarius: A technical whitepaper*. BenchChem. https://pdf.benchchem.com/15337/The_Discovery_and_Isolation_of_Tobramycin_A_Technical_Whitepaper.pdf

36. Пирог Т.П., Ключка Л.В., Ковшар І.Д. «Загальна мікробіологія і вірусологія. Модуль 2. Фізіологія росту та метаболізм мікроорганізмів» [Електронний ресурс]: методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної і заочної форм здобуття освіти. К.: НУХТ. – 2025. – 127 с. Шифр. 69.274. <https://elibrary.nuft.edu.ua/library/DocDownloadForm?docid=415503>

37. Inventor Surname, I. I. (1974). Title of the patent (Patent No. 3,853,709). United States Patent and Trademark Office. <https://www.freepatentsonline.com/3853709.html>

38. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: Підручник. / Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2004. – 472 с.
39. Lebrihi, A., Lamsaif, D., Lefebvre, G. *et al.* Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992, 37: 382–387. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00210997>
40. Prabakaran, G., & Hoti, S. L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 2008, 35(9): 961–965. doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0370-5>