

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
(ім'я та прізвище)

«___» лютого 2023 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

«___» лютого 2023 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: Одержання авермектинів культивуванням Streptomyces avermitilis

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

ГАЙДАМАКА Вадим Вадимович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Андрій КОТИНСЬКИЙ

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Гайдамаки Вадима Вадимовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Одержання авермектинів культивуванням Streptomyces avermitilis

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, канд, техн. наук,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затвердені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: Streptomyces avermitilis; цільовий продукт: авермектин; геометричний об'єм ферментера: 30м³, коефіцієнт заповнення: 0,66; біосинтез

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу авермектину - 3 аркуші формату А1

Апаратурна схема біосинтезу авермектину - 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	01.11.2022 – 12.11.2022	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	13.11.2022 – 22.11.2022	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	23.11.2022 – 29.11.2022	
4.	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	30.11.2022 – 05.12.2022	
5.	Специфікація обладнання	06.12.2022 – 13.12.2022	
6.	Опис технологічної схеми	14.12.2022 – 22.12.2022	
7.	Контроль виробництва	23.12.2022 – 29.12.2022	
8.	Охорона довкілля	02.01.2023 – 06.01.2023	
9.	Оформлення кваліфікаційної роботи	07.01.2023 – 11.01.2023	
10.	Оформлення графічної частини	12.01.2023 – 30.01.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Вадим ГАЙДАМАКА _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено проектуванню ділянки виробничого біосинтезу з метою одержання антибіотика авермектину у процесі культивування культури *Streptomyces avermitilis*. Робота складається зі вступу, восьми розділів, графічної частини (технологічної схеми) та списку використаної літератури, що містить 23 найменування. Загальний обсяг кваліфікаційної роботи – 80 сторінок, 12 рисунків, 13 таблиць, 2 креслення формату А3.

У кваліфікаційній роботі обґрунтовано та описано технологічний процес ділянки синтезу авермектину *Streptomyces avermitilis*, цей процес передбачає наявність блоку допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН при вирощуванні культури), етапи підготовки інокуляту та проведення виробничого біосинтезу цільового продукту у виробничому ферментері.

У вступі міститься інформація про актуальність використання макролідних антибіотиків, зокрема і авермектину, одержаних мікробіологічним способом. Як новизну запропоновано використання *Streptomyces avermitilis* Біок №. 04 для біосинтезу авермектину, висока концентрація якого досягається регуляцією оптимального значення швидкості споживання кисню продуцентом.

Проведено обґрунтування вибору біологічного агента *S. avermitilis* Біок №. 04, який характеризується здатністю до синтезу високих концентрацій авермектину (5,56 г/л). Визначено компонентний склад поживного середовища для вирощування *S. avermitilis* Біок №. 04, на основі чого було запропоновано схему його підготовки та обрано параметри стерилізації композицій.

Технологічна схема процесу представлена у графічній частині кваліфікаційної роботи на 2 аркушах формату А3.

Ключові слова: культивування, макролідні антибіотики, *Streptomyces avermitilis*, авермектин.

Зміст

Вступ	5	ст.
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	7	
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	14	
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	14	
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	22	
2.3 Таксономічний статус біологічного агента	25	
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	26	
3.1. Потреба у цільовому продукті	26	
3.2. Розрахунок потужності виробництва	26	
3.3. Розрахунок об'єму ферментера і кількості виробничих циклів	27	
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	28	
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	29	
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	29	
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	31	
4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	34	
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	37	
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	41	
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	55	
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу.....	55	
7.2. Мікробіологічний контроль	63	
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	63	
7.3.1. Концентрація біомаси.....	63	
7.3.2. Концентрація цільового продукту.....	64	
7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	64	
РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля	68	
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	68	
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	72	
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	72	
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	74	
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	74	
8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	76	
ЛІТЕРАТУРА	78	

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ		
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ		
Розробив		Гайдамака					
Перевірів		Красінько					
Затвердив		Стабніков					
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					4		
					Кафедра БТМ		

ВСТУП

В умовах науково-технічного прогресу та стрімкої інтенсифікації всіх сфер діяльності людини особлива увага приділяється проблемі широкого поширення методів хімічної промисловості в технології отримання сільськогосподарської продукції. Причиною глобалізації застосування пестицидних препаратів, які використовуються для боротьби з сільськогосподарськими шкідниками і зоопаразитами тварин, є їх економічна ефективність. Відомо, що використання пестицидів у всьому світі становить 2 млн тонн на рік.

Основна частка пестицидів припадає на інсектоакарицидні і гербіцидні препарати, що пояснюється їх широким використанням в сільському і лісовому господарствах, а також ветеринарії.

Було встановлено, що широке практичне застосування в різних галузях промислового тваринництва знаходять вітчизняні та зарубіжні лікарські препарати з сімейства макроциклічних лактонів. Вони використовуються у ветеринарії при арахноентомозах і нематодозах з лікувальною і профілактичною метою. Найбільш часто використовуються як антигельмінтні засоби у вівчарських і конярських господарствах Великобританії, а також у тваринництві США.

Велика група антипаразитарних засобів, що відносяться до макроциклічних сполук, представлена авермектином і рядом його похідних – еприномектин, дорамектин, селамектин та інші. Всі авермектинвмісні препарати мають високу нематоцидну, інсектицидну та акарицидну активність[1].

Технології отримання авермектинів традиційно передбачають отримання високопродуктивних штамів, які синтезують переважно авермектини В1, оптимізацію поживних середовищ для культивування продуцента і виробництво напівсинтетичних аналогів авермектинів В1 з поліпшеними фізико-хімічними та фармакологічними властивостями.

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ			
<i>Зм.</i>	<i>Кільк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Гайдамака</i>			Вступ			
<i>Перевірів</i>		<i>Красінько</i>					5	
<i>Затвердив</i>		<i>Стабніков</i>						
						Кафедра БТМ		

В останні роки розвивається ще один напрямок – синтез бажаних продуктів (наприклад, івермектина, мільбеміцинів) методами синтетичної біології. У 1980-1990-х роках виконувалися дослідження по повному хімічному синтезу деяких авермектинів - В1а і А1А, однак запропоновані схеми включали багато стадій при низькому виході цільового продукту (не більше 0,08%), що свідчить про перевагу мікробіологічного способу отримання авермектинів[2].

Зважаючи на вищеописану інформацію, **актуальністю** даної роботи є використання високопродуктивних штамів роду *Streptomyces* для виробництва авермектину, які б забезпечували отримання антибіотику з покращеними фізико-хімічними та фармакологічними властивостями у високих концентраціях, а також пошук та застосування методів регуляції рівня синтезу цільового антибіотику забезпеченням оптимальних умов вирощування продуцента авермектину.

Новизна даної роботи полягає у використанні штаму *Streptomyces avermitilis* Віок No. 04 для біосинтезу авермектину у високій концентрації, що досягається підтриманням оптимального значення швидкості споживання кисню культурою[10].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Авермектини – це 16-членні макроліди, продуцентами яких є штами *Streptomyces avermitilis*, дані сполуки мають широкий спектр нематичидної й інсекто-акарицидної дії та вже більше 35 років успішно застосовуються у терапії та профілактиці паразитарних хвороб людини, тварин, а також для захисту рослин[2].

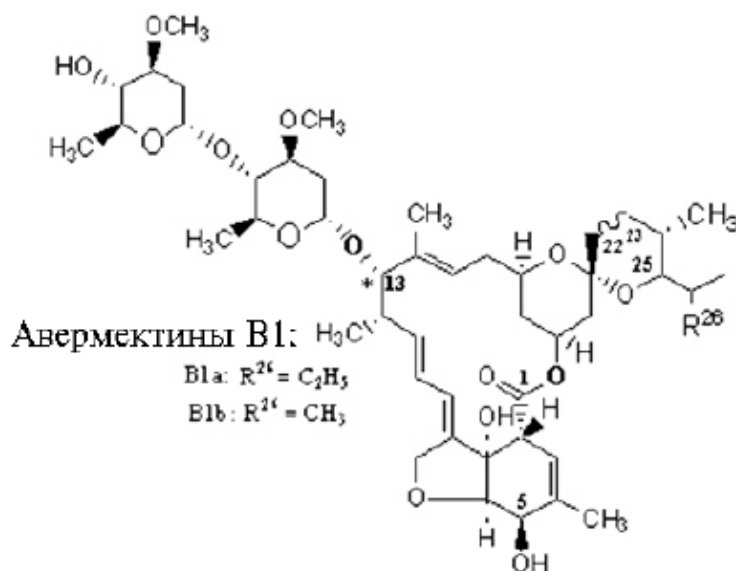


Рис. 1.1. Молекулярна структура авермектину

Щорічний обсяг продажів авермектинових субстанцій перевищує 850 млн USD. Інтегральна антипаразитарна дія субстанцій цього класу визначається їх здатністю взаємодіяти з глутаматзалежними (основна мішень) Cl^- іонними каналами, специфічними для безхребетних тварин, і ГАМК_A (γ-аміномасляна кислота)-залежними рецепторами. Крім того, авермектини мають афінність до різних іонних каналів і рецепторів з Cys-loop-суперсімейства, P2X₄ і фармезоїдних рецепторів, G-білок-пов'язаних калієвих каналів внутрішнього випрямлення (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels, GIRK receptors) та інших, що мають фармакотерапевтичну перспективу.

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ			
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Гайдамака			РОЗДІЛ 1.	Стадія	Аркуш	Аркушів
Перевірів		Княгінько					7	
Затвердив		Стабніков			ХАРАКТЕРИСТИК	ЦІЛЬОВОГО		
					КАТЕГОРІЯ			

Наприклад, у представника авермектинів івермектина виявлена здатність блокувати РАК1-залежний ріст клітин доброякісних і злоякісних новоутворень. Протипухлинну дію мають і інші представники 16-членних антипаразитарних макролідів. Нещодавно виявлено інгібування реплікації вірусу жовтої лихоманки і спорогонії у *Plasmodium falciparum* в *Anopheles gambiae* івермектином, антитуберкульозну дію авермектинів, зниження авермектинами поглинання етанолу клітинами, лікувальну дію івермектина при експериментальних патологічних станах, наприклад, ремієлінізації при аутоімунному енцефаліті в результаті алостеричної активації і відновлення порушених функцій АТФ-залежних іонофорних рецепторів P2X4Rs[2].

Культура *S. avermitilis* продукує чотири основні форми авермектинів - А₁, А₂, В₁, В₂, які відрізняються радикалами. У свою чергу, кожен компонент має 2 форми ізомерів: а і b [3].

Авермектини добре діють на шкідників при температурах 18-20 °С, а при температурах вище 28 °С їх ефективність зростає в 2 рази. Аверсектин С близький за властивостями до абамектину, але відрізняється ще більш високою біологічною активністю і меншою небезпекою. Авермектини не є стійкими сполуками, на поверхні рослин, ґрунту і води при дії сонячних променів і кисню їх період напіврозпаду становить всього 12 год. Термін їх захисної дії визначено в 5-7 днів. В умовах захищеного ґрунту вони досить швидко втрачають токсичність[4].

Всі авермектини є амфотерними сполуками, що володіють вираженими ліпофільними властивостями[5].

Авермектини добре розчиняються в ацетоні, хлорвмісних вуглеводнях, аліфатичних і ароматичних спиртах, етилен і пропілен-гліколі, низькомолекулярних поліетиленгліколях (поліетиленгліколь 200 і 400). Слабко розчиняються в гексані, петролейному ефірі і практично не розчиняються у воді.

Всі авермектини мають характерне поглинання в УФ-області спектра з максимумами поглинання при 237, 243 і 252 нм.

У хімічному відношенні авермектини близькі до макролідних антибіотиків: в їх склад входить 16-ти членний лактон і дисахарид, що складається з двох залишків олеандрози (2,6 - дидезокси-3-0 метил-L-арабіногексози).

Авермектини групи А відрізняються від авермектинів групи В наявністю у 5-го вуглецевого атома CH_3 -групи. Авермектини, що позначаються рубрикою 1 мають подвійну зв'язок між вуглецевими атомами $\text{C}_{22} = \text{C}_{23}$, тоді як у авермектинів позначених рубрикою 2 цей зв'язок відсутній: в положенні C_{22} з'являється ще один атом водню, а в положенні C_{23} - оксигрупи. Символи (a) і (b) позначають наявність у C_{23} 5-бутильної (a) або ізопропільної (b) групи. Всі індивідуальні авермектини мають високу протипаразитичну активність, але найбільш активним є авермектини групи В1а[5].

Структура авермектинів може бути зображена у вигляді загальної формули (рис. 1.2), яка служить тільки з метою ілюстрації:

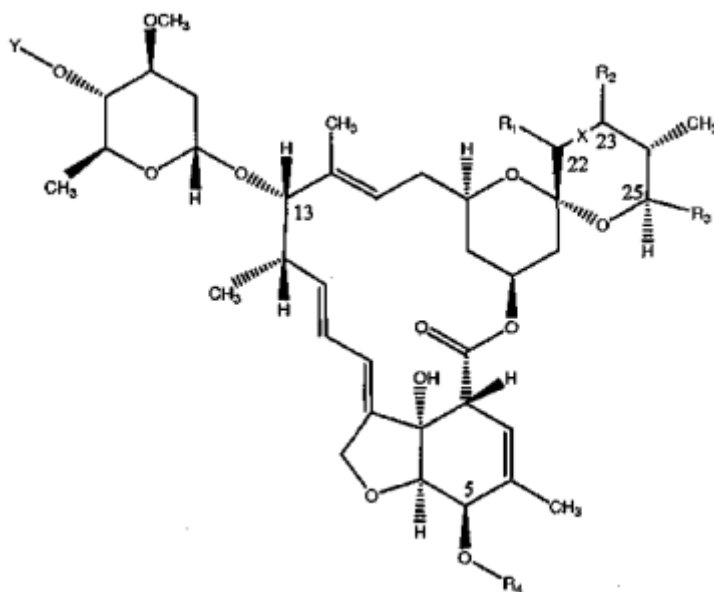


Рис. 1.2. Загальна структурна формула авермектинів

Коли X представляє подвійний зв'язок, замісники R_1 і R_2 у положеннях С-22 і С-23 не присутні. Ілюстративними замісниками у вищевказаній формулі є такі, де Y являє Н або при необхідності заміщену цукрову чи аміноцукрову

групу, R₁ представляє Н, R₂ представляє Н або гідрокси, R₃ являє собою алкіл або циклоалкіл і R₄ представляє Н або алкіл[6].

Успіхи фармацевтичної промисловості у виробництві авермектину є показовим прикладом «симбіозу» біотехнології (біосинтезу) та тонкої хімічної технології (органічного синтезу), в якому можна виділити наступні напрямки:

- Створення високопродуктивних штамів продуцентів авермектинів *S. avermitilis*;
- Хімічна модифікація метаболітів *S. avermitilis* з метою отримання більш ефективних та екологічно безпечних аналогів, в найбільшій мірі враховуючих особливості їх застосування у ветеринарії, медицині та сільському господарстві;
- Створення штамів, продукуючих переважно найбільш затребувані авермектини В1 (В1а та В1b)[7].

Як було вказано вище, авермектини синтезуються у вигляді комплексу сполук, так, комплекс, що містить 8 авермектинів отримав назву Аверсектин. У свою чергу, очищений (ступінь очищення не менше 90%) природний авермектиновий комплекс отримав назву Аверсектин С[3].

Природний авермектин В1, ізольований з комплексу, отримав назву абамектин. Один з перших препаратів для захисту рослин на основі діючої речовини абамектин (1,8%) зареєструвала швейцарський хімічна компанія Сингента під назвою «Вертімек». Крім високої антипаразитарної активності, абамектин відрізняється високою токсичністю для теплокровних і нецільових об'єктів навколишнього середовища.



Рис. 1.3. Інсектицид-акарицид Вертімек 10 мл, Syngenta

Молекулярна формула: $C_{48}H_{72}O_{14}$ (авермектини V1a); $C_{47}H_{70}O_{14}$ (авермектини V1b).

В результаті хімічної модифікації абабектина було отримано Івермектин. Івермектин – напівсинтетичний авермектин, являє собою 22,22-дигідроавермектин V1a і V1b, відрізняється меншою токсичністю для теплокровних організмів, кращою розчинністю і більшою стабільністю при тій же широті спектру та інтенсивністю протипаразитарного дії.



Рис. 1.4. Івермектин-10

Висока активність авермектинів проти членистоногих і нематод при малій концентрації послужило поштовхом для виробництва сотень препаратів для ветеринарії та агрономії. Велика частина ветеринарних препаратів містить діючу речовину напівсинтетичний Івермектин. Це: Івомек, Іверсект, Івермек, Баймек, Цевамек, ІВЕРГО, Бімектін, Пандекс, Івертін, Новомек, Гіподастін і ін.

Препарати для захисту рослин випускаються на основі більш дешевої сировини Аверсектина-С (Фітоверм, Актофіт), або фактичного аналога Авертина N (Акарин, Агравертин, Іскра-Біо). Авермектини в чистому вигляді є сильно токсичними для тварин і людини. Тому 3 клас небезпеки (помірно небезпечні) досягається зменшенням концентрації діючої речовини в препаративної формі до 0,2%.

Всі агропрепарати авермектинової групи містять розчинник – етиловий спирт. Тому, виходячи з великої норми витрати (в силу малої концентрації діючої речовини), обробка субстрату з рослинами неприпустима. Можливі опіки кореневої системи. При позакореневій обробці спирт швидко випаровується, фітотоксичність є мінімальною. Для боротьби з фітонематодами виробляються спеціальні авермектинові препарати на твердій

органічній основі. Натуральні авермектини погано розчиняються у воді, тому не мають на рослинах системних властивостей, і діють тільки контактно-кишково.

Однак, авермектини досить добре розчинні в органічних розчинниках, легко переносяться з жирами, тому проявляють найкращі свої властивості у ветеринарії. Використовуються як у вигляді мазей для зовнішнього застосування, так і у вигляді 1% препаратів для ін'єкцій (підшкірне введення)[3].



Рис. 1.5. Івермектин крем 1%

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Серед сучасних інсектицидних та антигельмінтних сполук авермектини, віднесені до класу макролідних антибіотиків, є найбільш ефективними. Вони мають специфічну антипаразитарну активність щодо круглих червів, кліщів, а також інших поширених нематод і комах, що вражають худобу, птицю і сільськогосподарські рослини.

Типовий продуцент авермектинів – *Streptomyces avermitilis* синтезує вісім близькоспоріднених сполук. Відомі штами-продуценти авермектинів, використовувані для промислового виробництва авермектину В1 або загальної кількості всіх авермектинів. Однак сумарний вміст авермектинів, що продукується цими штамми, в даний час недостатньо для конкурентоспроможного, рентабельного промислового виробництва авермектинів, їх напівсинтетичних похідних та відповідно препаратів на їх основі[8].

В літературних джерелах представлено роботи зарубіжних вчених, у яких наведено результати їх дослідження особливостей біосинтезу авермектину штамми *S. avermitilis*[9-11].

Наприклад, Не зі співавторами повідомили про можливість отримання підвищених концентрацій авермектину при вирощуванні мутантного штаму *S. avermitilis* D151, порівняно з показниками, встановленими для вихідного штаму ATCC31267[9].

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ		
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Гайдамака				Стадія	Аркуш	Аркушів
Перевіриє	Красінько					14	
					РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА		
Затвердиє	Стабніков						

Так, було встановлено, що ген SAV151, який кодує регулятор транскрипції сімейства TetR, здатен впливати на процес біосинтезу авермектину – делеція SAV151 призвела до збільшення кількості синтезованого авермектину, а отриманий мутант делеції, в якому ген SAV151 був переважно видалений шляхом рекомбінації подвійного кросинговеру, відповідно був позначений як D151. Вирощування продуцента проводили у середовищі такого складу, г/л:

Кукурудзяний крохмаль – 70,

Соєвий шрот – 15,

Дріжджовий екстракт – 10,

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,5,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5,

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,005 (5 мг),

$CaCO_3$ – 1.

Культивування здійснювали протягом 10 діб при 220 об/хв та температурі 28°C. За таких умов вирощування мутантного штаму *S. avermitilis* D151 в кінці культивування отримали 250 мкг/мл або 0,25 г/л авермектину.

Автори статті[10] дослідили процес періодичного культивування авермектину В1а *S. avermitilis* Біок No. 04 шляхом регулювання швидкості поглинання кисню (OUR) під час фази росту клітин. Швидкість поглинання кисню контролювалась регулюванням аерації та перемішування. Результат показав, що швидкість поглинання кисню значно впливає на ріст клітин та синтез антибіотиків. Біосинтез авермектину В1а можна ефективно посилити, коли швидкість поглинання кисню стабільно утримується на належному рівні 15-20 ммоль/л/год.

Культивування проводили протягом 10 діб при 28 °С, 120 об/хв та вмісту кисню 15-20 ммоль/л/год. Середовище для отримання авермектину мало наступний склад, г/л:

Кукурудзяний крохмаль – 149,57;

Дріжджовий екстракт – 8,92;

α -амілаза – 0,1;

Соєве борошно – 28;
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,022;
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,0023;
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,25;
 CoCl_2 – 0,02;
 CaCO_3 – 0,8.

Так, по закінченню культивування штаму *S. avermitilis* Біок No. 04 за оптимального значення швидкості поглинання кисню 18,5 ммоль/л/год вдалось досягти синтезу авермектину у кількості 5568 мг/л, тобто 5,56 г/л.

Стимулюючий вплив на виробництво авермектину В1а можна пояснити покращеним надходженням у клітини пропіонової та оцтової кислот – попередників авермектину В1а. Дослідники наголосили, що даний метод контролю під час фази росту клітин може бути простим способом покращення промислового виробництва авермектину.

У свою чергу, Meng зі співавторами у роботі[11] використали побудовані мутанти делеції кластеру біосинтетичних генів *grp* для поліпшення виробництва авермектину. Середовище для вирощування штаму *S. avermitilis* AV010 містило такі компоненти, г/л:

Кукурудзяний крохмаль – 140;
Соєве борошно – 28;
Дріжджовий екстракт – 10;
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,022;
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,0023;
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5;
 CoCl_2 – 0,02;
 CaCO_3 – 0,8;
 α -амілаза – 0,1.

Так, при здійсненні культивування штаму AV010 при 28 °С, 250 об/хв протягом 240 год (10 діб) рівень синтезу авермектину зріс з 3582 до 4450 мг/л або 4,45 г/л. Транскрипційний аналіз показав, що видалення кластеру генів *grp* стимулювало транскрипцію *aveR*, що призводило до збільшення транскрипції

біосинтетичного гена *aveA1* і, як наслідок, до збільшення продукування авермектину.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів авермектину

Продуцент	Поживне середовище, г/л	Концентрація авермектину, г/л	Параметри культивування	Література
<i>S. avermitilis</i> D151	Кукурудзяний крохмаль – 70, Соевий шрот – 15, Дріжджовий екстракт – 10, K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O – 0,5, MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5, CoCl ₂ ·6H ₂ O – 0,005 (5 мг), CaCO ₃ – 1.	0,25	10 діб, 220 об/хв, 28°C	[9]
<i>S. avermitilis</i> Biok No. 04	Кукурудзяний крохмаль – 149,57; Дріжджовий екстракт – 8,92; α -амілаза – 0,1; Соеве борошно – 28; Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O – 0,022; MnSO ₄ H ₂ O – 0,0023; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,25; CoCl ₂ – 0,02; CaCO ₃ – 0,8.	5,56	10 діб, 28 °C, 120 об/хв, вміст кисню 18,5 ммоль/л/год	[10]
<i>S. avermitilis</i> AV010	Кукурудзяний крохмаль – 140; Соеве борошно – 28; Дріжджовий екстракт – 10; Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O – 0,022; MnSO ₄ H ₂ O – 0,0023; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,5; CoCl ₂ – 0,02; CaCO ₃ – 0,8; α -амілаза – 0,1.	4,45	10 діб, 250 об/хв, 28°C	[11]

Зважаючи на вищеописані дані, а також інформацію, наведену у табл. 2.1, для порівняння було обрано три штами – *S. avermitilis* D151, *S. avermitilis* Biok No. 04 та *S. avermitilis* AV010, які відповідно характеризуються різним рівнем біосинтезу авермектину. Оскільки умови культивування та склад поживного середовища у наведених статтях приблизно однакові, варто звернути увагу на кількість цільового продукту, синтезовану продуцентом за встановлених параметрів. Так, штаму *S. avermitilis* D151 синтезував найменшу кількість авермектину – всього 0,25 г/л, у той час як при вирощуванні штаму AV010 отримали значно більше авермектину – 4,45 г/л. Однак найкращим

продуцентом авермектину є *S. avermitilis* Biok No. 04, адже рівень біосинтезу цільового продукту за вирощування даного штаму був найвищим і становив 5,56 г/л.

Отже, з огляду на результати порівняння наведених штамів, серед представлених продуцентів найкращим є саме *S. avermitilis* Biok No. 04, зважаючи на його здатність продукувати високу концентрацію авермектину.

Для проведення біосинтезу авермектину необхідно підібрати оптимальні параметри та режими процесу культивування продуцента, на вибір способу вирощування мають вплив фізіолого-біохімічні особливості мікроорганізму та відповідно особливості хімічної структури і властивостей антибіотика.

Штам *S. avermitilis* Biok No. 04 є мезофілом, оскільки росте за температури 30°C, облігатним аеробом, оскільки синтез авермектину проходить за оптимального значення швидкості поглинання кисню 18,5 ммоль/л/год, вирощування якого проводять за рН 7,0-7,2. Зважаючи на це, необхідно усунути ризик контамінації поживного середовища сторонньою мікрофлорою, яка представлена іншими мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами, тому при культивуванні штаму Biok No. 04 необхідним є забезпечення асептичних умов, які передбачають стерилізацію обладнання, комунікацій, аераційного повітря та поживного середовища.

Як відомо, авермектин штаму *S. avermitilis* Biok No. 04 є екзометаболітом, тобто виділяється у культуральну рідину, зважаючи на це культивування необхідно проводити глибинним способом. Також доцільним буде проведення біосинтезу в періодичному режимі, оскільки максимальний рівень синтезу авермектину спостерігався по закінченню процесу культивування (10 діб). Періодичне культивування дозволить не лише отримати найвищу концентрацію цільового продукту, але і досягти повного споживання субстрату й інших компонентів поживного середовища продуцентом.

Таким чином, для синтезу авермектину штамом-продуцентом *S. avermitilis* Біок No. 04 доцільним буде обрати періодичне глибинне культивування із забезпеченням аерації та асептичних умов.

Виробничий біосинтез авермектину *S. avermitilis* Біок No. 04 проводять у ферментері об'ємом 30 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5. Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{роб}} = 30 \times 0,5 = 15 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 15 м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 15 \cdot 0,1 = 1,5 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати при культивуванні штаму Біок No. 04 в посівному апараті об'ємом 3 м³. Щоб отримати 1,5 м³ або 1500 л культуральної рідини, необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 1500 \cdot 0,1 = 150 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати в інокуляторі об'ємом 300 л. Інокулят об'ємом 150 л можна отримати з:

$$V_{\text{роб.3}} = 150 \cdot 0,1 = 15 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати в інокуляторі об'ємом 30 л. Інокулят об'ємом 15 л можна отримати з:

$$V_{\text{роб.4}} = 15 \cdot 0,1 = 1,5 \text{ л посівного матеріалу}$$

Такий об'єм посівного матеріалу можна виростити в колбах на качалці.

Таким чином, процес одержання інокуляту для забезпечення виробничого біосинтезу авермектину *S. avermitilis* Біок No. 04 у ферментері об'ємом 30 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у чотири етапи.

Одержання авермектину при вирощуванні штаму *S. avermitilis* Біок No. 04 проводять у середовищі, що містить такі компоненти, г/л[10]:

Кукурудзяний крохмаль – 149,57;

Дріжджовий екстракт – 8,92;

α-амілаза – 0,1;

Соєве борошно – 28;

Na₂MoO₄ 2H₂O – 0,022;

MnSO₄ H₂O – 0,0023;

(NH₄)₂SO₄ – 0,25;

CoCl₂ – 0,02;

CaCO₃ – 0,8.

В якості джерела вуглецю та енергії у складі даного поживного середовища виступає кукурудзяний крохмаль (149,57 г/л).

Одержання авермектину при вирощуванні штаму *S. avermitilis* Biok No. 04 проводять у середовищі, що містить такі компоненти, г/л[10]:

Кукурудзяний крохмаль – 149,57;

Дріжджовий екстракт – 8,92;

α-амілаза – 0,1;

Соєве борошно – 28;

Na₂MoO₄ 2H₂O – 0,022;

MnSO₄ H₂O – 0,0023;

(NH₄)₂SO₄ – 0,25;

CoCl₂ – 0,02;

CaCO₃ – 0,8.

В якості джерела вуглецю та енергії у складі даного поживного середовища виступає кукурудзяний крохмаль (149,57 г/л).

Приготування. У даному поживному середовищі містяться кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт, соєве борошно та α-амілаза (для покращення розчинності цукровмісних речовин) – ці компоненти необхідно попередньо приготувати в окремому збірнику, для покращення розчинення слід здійснити подачу гарячої води у сорочку збірника.

Для вирощування інокуляту в посівних апаратах та для подальшого проведення біосинтезу авермектину приготування розчину солей доцільно здійснити безпосередньо в інокуляторах та ферментері відповідно, апарати мають бути забезпечені перемішувачами пристроями для покращення розчинності компонентів.

Стерилізація. Оскільки у даному поживному середовищі присутні такі термолабільні речовини як кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт,

соєве борошно та α -амілаза, необхідно забезпечити відповідний режим стерилізації – за температури 112 °С, тиску 0,05 МПа, протягом 30 хв.

Для стерилізації поживного середовища з метою отримання інокуляту у колбах на качалках, в інокуляторах, а також для виробничого біосинтезу, слід поділити компоненти поживного середовища на відповідні композиції зважаючи на особливості стерилізації даних речовин:

Композиція I: кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт, соєве борошно, α -амілаза (режим стерилізації: 112°С, 30 хв).

Композиція II: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CoCl_2 , CaCO_3 (режим стерилізації: 131°С, 50 хв)

Стерилізацію компонентів середовища для отримання інокуляту в інокуляторах та для виробничого культивування слід здійснити безперервним способом, адже об'єм ферментера становить 30 м³.

Окрім цього, для регуляції рН середовища до оптимального значення для культивування продуцента авермектину слід забезпечити приготування 6%-го розчину соляної кислоти та 6%-го розчину гідроксиду натрію.

Отже, для виробничого біосинтезу авермектину було обрано штам *S. avermitilis* Біок No. 04, при культивуванні якого спостерігали високий рівень синтезу цільового продукту – 5,56 г/л. Для синтезу авермектину штамом-продуцентом *S. avermitilis* Біок No. 04 доцільним буде обрати періодичне глибинне культивування із забезпеченням аерації та асептичних умов із забезпеченням таких параметрів процесу: температура 28 °С, інтенсивність перемішування – 120 об/хв, швидкість споживання кисню 18,5 ммоль/л/год, тривалість культивування 10 діб[10].

Визначили, що для забезпечення біосинтезу авермектину у виробничому ферментері об'ємом 30 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 отримання інокуляту буде здійснюватись у чотири етапи.

Одержання авермектину при вирощуванні штаму *S. avermitilis* Біок No. 04 проводять у середовищі, що містить такі компоненти, г/л[10]:

Кукурудзяний крохмаль – 149,57;

Дріжджовий екстракт – 8,92;

α -амілаза – 0,1;
Соеве борошно – 28;
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,022;
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,0023;
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,25;
 CoCl_2 – 0,02;
 CaCO_3 – 0,8.

Для стерилізації поживного середовища з метою отримання інокуляту у колбах на качалках, в інокуляторах, а також для виробничого біосинтезу, слід поділити компоненти поживного середовища на відповідні композиції зважаючи на особливості стерилізації даних речовин:

Композиція I: кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт, соєве борошно, α -амілаза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CoCl_2 , CaCO_3 (режим стерилізації: 131°C, 50 хв)

Для регуляції рН середовища до оптимального значення для культивування продуцента авермектину слід забезпечити приготування 6%-го розчину соляної кислоти та 6%-го розчину гідроксиду натрію.

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Морфолого-культуральні ознаки. На середовищі Хопвуда на 14 добу утворює колонії неправильної форми діаметром до 6 мм. Контур краю лопатевий. Колонії опуклі. Поверхня колонії суха, шорстка, опущена, складчастість бородавчата. Колонії сірого кольору з ділянками білого кольору. Структура колоній неоднорідна, консистенція шкіряста. Пігмент не утворюється[8].

На середовищі Гаузе з глюкозою на 14 добу утворює колонії діаметром до 8 мм, неправильної форми з хвилястим краєм. Рельєф колоній конусоподібний. Часто колонії мають радіальну складчастість. Поверхня колоній суха, шорстка, опущена, але є ділянки без опущень. Колір колоній

світло-сірий і темно-сірий. Структура колоній неоднорідна, консистенція щільна. У середовище виділяється світло-коричневий пігмент.

На середовищі YME на 5 добу утворює колонії двох морфологічних типів: I - колонії білого кольору з кремовим відтінком, добре опущені, II - колонії опуклі, майже круглої форми з рівним краєм і невеликою складчастістю. Колір колоній сірий, в центрі більш світла ділянка. Діаметр колоній 2,0 - 2,5 мм. Поверхня колоній суха, шорстка, неопущена. Обидва типи колоній зі зворотного боку коричневого кольору. Виділяють в середовище коричневий пігмент. Колонії злегка заглиблені в агар. На 14 добу утворює колонії неправильної форми з хвилястим краєм діаметром до 10 мм. Рельєф колоній конусоподібний. Поверхня колоній суха, шорстка, добре опущена. Колір колоній сірий з білими краплями. Структура неоднорідна, консистенція щільна.

На середовищі CP-6 на 5 добу утворює колонії майже круглої форми сірувато-коричневого кольору. Діаметром 2 мм. Рельєф колоній куполоподібний. Складчастість погано виражена. У середовище виділяє темно-коричневий пігмент. Поверхня колоній суха, шорстка, опущення відсутнє. На 11 добу колонії майже круглої форми зі злегка хвилястим краєм, опуклі з радіальною складчастістю, сіро-коричневого кольору і з трохи більш темним центром. Поверхня суха, шорстка, без опущення. Виділяє темно-коричневий пігмент.

На середовищі YMS на 5 добу утворює світло-сірі і майже білі колонії приблизно в рівному співвідношенні. Форма колоній кратероподібна, діаметр 3,0 - 3,5 мм. Поверхня добре опущена, складчаста. Колонії злегка заглиблені в агар, виділяють темно-коричневий пігмент. На 11 добу колонії майже круглої форми з хвилястим краєм, діаметром 5,5 - 6,0 мм, з опуклим рельєфом. Колір колоній сірий, поверхня суха, шорстка[8].



Рис. 2.1. Вигляд *Streptomyces avermitilis* на щільному поживному середовищі[13].

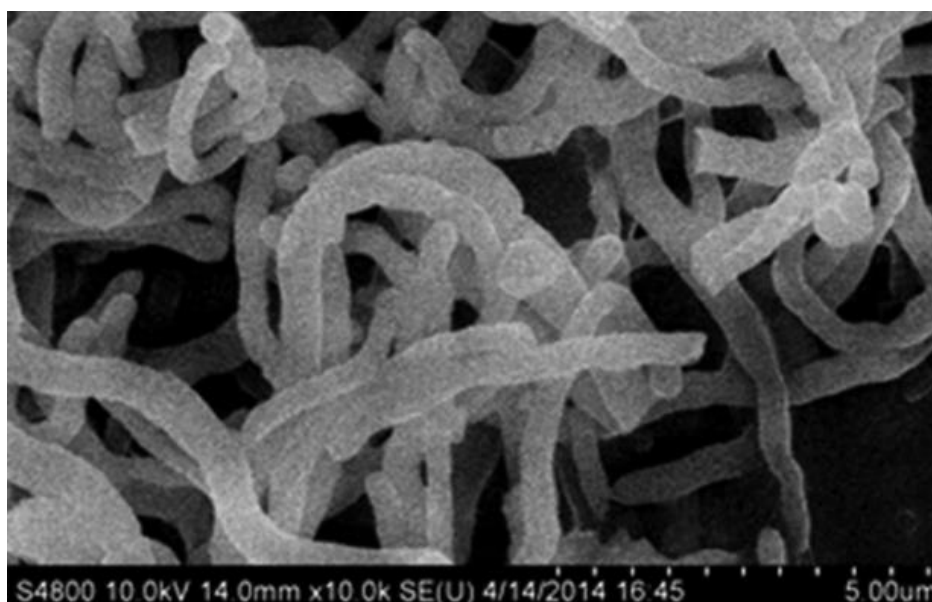


Рис. 2.2. Вигляд *Streptomyces avermitilis* у полі зору скануючого електронного мікроскопу[14].

Хороша споруляція спостерігається на середовищах CP-6, мінімальній Хопвуда і YMS. Спорофори утворюють спіралі у вигляді розгалужень повітряного міцелію. Компактні спіралі розкриваються в міру старіння культури. Кількість спор в ланцюжках не більше 15, спори зазвичай сферичної і овальної форми[8].

Фізіолого-біохімічні ознаки. У мінімальному середовищі Хопвуда з 1% джерела вуглецю зростає, використовуючи в якості джерела вуглецю глюкозу,

фруктозу, манозу, маніт, інозит, рамнозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, арабінозу і ксилозу.

Гідролізує желатину і казеїн, згортає молоко.

Добре росте і утворює повітряний міцелій в інтервалі температур від 27 до 37°C, не росте при 50°C[8].

2.3 Таксономічний статус біологічного агента

Згідно визначника бактерій Бергі, штам-продуцент авермектину *Streptomyces avermitilis* Біок No. 04 займає наступне систематичне положення[12]:

Домен	<i>Procaryota</i>
Царство	<i>Eubacteria</i>
Тип	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Thallobacteria</i>
Порядок	<i>Actinomycetales</i>
Рід	<i>Streptomyces</i>
Вид	<i>avermitilis</i>

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Авермектини – це 16-членні макроліди, продуцентами яких є штами *Streptomyces avermitilis*, дані сполуки мають широкий спектр нематичидної й інсекто-акарицидної дії та вже більше 35 років успішно застосовуються у терапії та профілактиці паразитарних хвороб людини, тварин, а також для захисту рослин.

На сьогоднішній день на ринку України препарати для захисту рослин випускаються у вигляді компонентів авермектиного комплексу у рідкій формі. Така форма забезпечує кращу можливість розведення концентрату препарату авермектину для отримання робочого розчину для обробки рослин.

У таблиці 3.1 наведені деякі виробники препаратів авермектинів, що застосовуються для захисту рослин.

Таблиця 3.1

Деякі виробники авермектинів

Препарат	Виробник
АКТОВЕРМ	БТУ-Центр, Україна
АКТОФІТ	БіоветФарм, Україна
Біоінсекто-акарицид	ENZIM Agro, Україна
ВЕРТИМЕК	Syngenta Сингента Швейцарія

3.2. Розрахунок потужності виробництва

У складі препаратів з авермектинами міститься 18 г/л діючої речовини. Витрати: 0,5 л препарату на 1 га. Отже,

$0,5 \times 18 = 9$ г/л – кількість препарату що буде використовуватися на 1 га оброблюваної площі.

Оскільки на території України 3,5 млн га сільськогосподарських земель, розраховуємо, що

$3,5 \times 9 = 31,5$ т – річна потреба авермектинів

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ			
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Гайдамака						26	
Перевірів	Княгінько							
Затвердив	Стабніков							
						Кафедра БТМ		

Враховуючи, що на ринку України є велика кількість препаратів з аверметинами виробників інших країн, а також використання препаратів на основі інших речовин зробимо розрахунок на 9% від річних потреб:

$$31,5 \text{ т} \times 0,09 = 2,835 \text{ т авермектинів.}$$

Розрахунок потужності виробництва для культивування *S. avermitilis* Біок No, щоб отримати 2,835 т авермектинів.

Оскільки концентрація у культуральній рідині становить $5,56 \text{ г/л} = 5,56 \text{ кг/м}^3$, а потреба в Україні 2,835 т/рік, то розрахуємо об'єм культуральної рідини за рік:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 2835/5,56 = 510 \text{ м}^3$$

Тепер необхідно врахувати втрати, які можуть виникнути в процесі виробництва, вони становлять 10%, отже, з урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 510 + 10\% = 561 \text{ м}^3.$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера і кількості виробничих циклів

1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300.

Ефективний фонд робочого часу $N_{\text{еф.}} = 300 \times 24 = 7200 \text{ год.}$

2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 240 + 14 = 254 \text{ (год), де}$$

$T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (4 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

3. Розраховуємо кількість циклів на рік:

$$n_{\text{ц}} = N_{\text{еф}}/T_{\text{ц}} = 7200/254 = 28$$

4. Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{\text{кр}}^{\text{ц}} = V_{\text{кр}}^{\text{річ}}/n_{\text{ц}} = 561/28 = 20 \text{ м}^3$$

Обераємо ферментер об'ємом 30 м^3 з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,66$.
Об'єм культуральної рідини становить $V_{к,р} = 19,8 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування *S. avermitilis* Віок No. 04 для одержання авермектину здійснюють у ферментері об'ємом 30 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,66.

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

$$V_{роб} = V_{г.ф} \times K_{зап}$$

де: $V_{г.ф}$ – геометричний об'єм ферментера; $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення, 0,66.

$$V_{роб} = 30 \times 0,66 = 19,8 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання $19,8 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб1} = 19,8 \times 0,1 = 1,98 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час вирощування культури у посівному апараті об'ємом 3 м^3 , який є інокулятором. Для одержання $1,98 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{роб2} = 1,98 \times 0,1 = 198 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного можна одержати у процесі вирощування культури у стандартному інокуляторі об'ємом 300 л

198 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{роб3} = 198 \times 0,1 = 19,8 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 30 л. Для одержання 19,8 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{роб4} = 19,8 \times 0,1 = 1,98 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного одержують культивуванням *S. avermitilis* Віок No. 04 в колбах на качалці. Для цього потрібно 2 колби об'ємом 1,5 л.

Таким чином, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу авермектинів у ферментері об'ємом 30 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,66 буде проходити у чотири етапи, п'ятим етапом буде сам процес біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Існує два типи культивування мікроорганізмів: поверхневе та глибинне[2].

Культивування на поверхні рідкого, концентрованого поживного середовища. У цьому випадку мікроорганізми отримують кисень безпосередньо з повітря. При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу контакту між середовищем і повітрям. Тому тонкий шар середовища наливають у посуд з широким дном, наприклад, чашку Петрі, матрац, пробірку зі скошеним дном або колбу.

Глибинне культивування в рідкому середовищі. У глибинній культурі мікроорганізми використовують кисень, розчинений у воді. Оскільки розчинність кисню у воді є недостатньою, до рідкого середовища необхідно додавати штучне повітря, щоб дозволити аеробним бактеріям рости в товщі рідкого середовища. Найпростіший спосіб зробити це - потрясти колбу або пробірку спеціальним валиком. Це збільшує площу поверхні, на якій культуральне середовище контактує з киснем. У промисловості, коли мікроорганізми культивують у ферментаторах, стерильний кисень часто подають у середовище одночасно з механічним перемішуванням[2].

Відомо, що авермектин штаму *S. avermitilis* Біок № 04 вивільняється у вигляді екзометаболіту, тобто в живильному середовищі, що вимагає більш глибокого культивування. Максимальна кількість авермектину, синтезованого наприкінці культивування (10-й день), свідчить про необхідність проведення періодичного біосинтезу. Періодичне культивування не тільки дозволяє отримати найвищу концентрацію цільового продукту, але й дозволяє продуценту повністю споживати субстрат та інші компоненти живильного середовища[3].

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ		
<i>Зм.</i>	<i>Кільк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>	<i>Гайдамака</i>				<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушіє</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Красінько</i>					29	
<i>Затвердив</i>	<i>Стабніков</i>				Кафедра БТМ		
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ							

Штам *S. avermitilis* Biok No. 04 є облігатним аеробом, оскільки синтез авермектину проходить за оптимального значення швидкості поглинання кисню 18,5 ммоль/л/год, зважаючи на це необхідно забезпечити продування через середовище стерильного кисню. Для покращення розчинності кисню поживне середовище перемішують за допомогою мішалки – для культивування *S. avermitilis* Biok No. 04 режим перемішування становить 120 об/хв[3].

Штам *S. avermitilis* Biok No. 04 є мезофілом та нейтрофілом, оскільки росте за температури 30°C та рН 7,0-7,2.

Отже, ферментер для виробничого культивування авермектинів *S. avermitilis* Biok No. 04 повинен бути оснащений барботером для продування через середовище стерильного кисню, лопатевою мішалкою для покращення розчинності кисню та датчиками контролю температури, швидкості поглинання кисню та рН середовища для підтримки необхідних параметрів при культивуванні авермектинів. Ферментер та інокулятори повинні мати сорочку для подачі глухої пари при стерилізації середовища.

Для синтезу авермектинів з використанням для обробки смородини штам-продуцент *S. avermitilis* Biok No. 04 культивують у ферментері об'ємом 30 м³. Вищеописаним параметрам відповідає ферментер Biostat STR® Generation 3 компанії «Sartorius»[4] (рис. 4.1). Ферментер даного об'єму буде виготовлятися під індивідуальне замовлення.

Характеристики:

- ✓ Нержавіюча сталь AISI 316 для всіх поверхонь, що контактують із продуктом, AISI 304 - для поверхонь, що не контактують із продуктом.
- ✓ Співвідношення діаметра та висоти: 1 : 2,5-3.
- ✓ Розрахунковий тиск у ємності: 0,3 МПа, розрахунковий тиск у сорочці: 0,35 МПа.
- ✓ Торосферичне дно без застійних зон.

- ✓ Діапазон робочих температур – від кімнатної температури +8°C до +60°C. Максимальна робоча температура – до 135°C.
- ✓ Підсвічування внутрішнього обсягу ферментера.



Рис. 4.1. Загальний вигляд ферментера виробництва компанії «Sartorius»

Отже, культивування авермектинів штамом *S. avermitilis* Biok No. 04 будемо здійснювати у ферментері Biostat STR® Generation 3.

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Штам *S. avermitilis* Biok No. 04 є облигатним аеробом, оскільки синтез авермектину проходить за оптимального значення швидкості поглинання кисню 18,5 ммоль/л/год, зважаючи на це необхідно забезпечити продування через середовище стерильного кисню.

Забір атмосферного повітря

Повітря завжди містить водяну пару, тверді частинки, мікробні клітини та спори. Наприклад, технологічне повітря містить до 4,5% актиноміцетів, 33,5% коків, 22,5% бацил, 18,7% спор паличкоподібних грибів і 8,1% плісняви. Склад цих мікроорганізмів у повітрі не є постійним і залежить від пори року, погодних умов, місця розташування підприємства та висоти повітрязабірника. Концентрація мікроорганізмів є найвищою на підлозі та землі, де вона

зменшується і залишається постійною з висотою. Тому очищення повітря та масове виробництво стерильного повітря є одним з ключових завдань біотехнології [5].

VIN 3200 A14 - це горизонтальний ферментер висотою 1950 мм = 1,95 м. З відкритою кришкою висота обладнання становить $2,9 + 0,97 \approx 3$ м, а висота стелі приміщення повинна бути близько 5 м. Таким чином, висота виробничої будівлі становить близько 6,5 м, враховуючи дах будівлі (1,5 м) і висоту стелі (5 м). Щоб запобігти потраплянню забруднюючих частинок у виробничу будівлю, відбір проб зовнішнього повітря здійснюється на висоті ≈ 10 м від підлоги першого поверху будівлі, оскільки повітрязабірник розташований на висоті 3 м від даху будівлі.

Потім зібране повітря очищається за допомогою фільтра грубої очистки.

Грубе очищення повітря

На цьому етапі з повітря видаляється більшість великих частинок пилу розміром 5-10 мікрон. Фільтруючі матеріали, що використовуються в попередніх фільтрах, включають багат шарову дротяну сітку, металеву стружку, полімерні матеріали, грубі мінеральні волокна та синтетичні волокна. Фільтри цього класу включають масляні та віскозні фільтри, в яких масло наноситься на металеву сітку. Олія допомагає осідати пилу на фільтрі та утримувати пил. Змочувальний агент, що використовується у вісцинових фільтрах, має бактерицидні властивості, а це означає, що мікроорганізми, які осідають разом з пилом, втрачають здатність розмножуватися і гинуть. Губчасті фільтри з модифікованого пінополіуретану також використовуються як попередні фільтри. Пінополіуретан має ефективність збору атмосферного пилу 50-85% і пилоємність 0,2 кг/м². Максимальна робоча температура пінополіуретану становить 121 °C[6].

Стабілізація термодинамічних показників повітря

Поршневі компресори або турбокомпресори можуть використовуватися для стиснення і нагнітання повітря. Стиснення повітря супроводжується сильним нагріванням, тому після компресора повітря потрапляє в

холодильник. Щоб видалити зайву вологу з повітря, його потрібно охолодити до температури нижче точки роси. Перед фільтром встановлюється система з одного великого контейнера (ресивера) або система менших контейнерів для вирівнювання тиску в системі і забезпечення подачі повітря до фільтра. Потім повітря спочатку направляється на головний фільтр, а потім на окремі фільтри для очищення[6].

Попередня очистка повітря в головному фільтрі

Цей етап очищення відбувається в основному фільтрі. Ефективність основного фільтра в очищенні повітря від забруднень, викликаних частинками діаметром від 1 до 1,5 мкм, тобто бактеріями, досягає 98%[6].

Волокнисті матеріали широко використовуються як фільтруючі матеріали в основних фільтрах. Волокнисті фільтри є об'ємними фільтрами, оскільки вони призначені для уловлювання і накопичення частинок не тільки на поверхні фільтруючого матеріалу, але і в глибині шарів. Для фільтрів з заданим діаметром волокон характеристики очищення можна змінювати, збільшуючи щільність укладання волокон і товщину шару фільтруючого матеріалу у фільтрі.

Найбільш оптимальним є використання багат шарової конструкції з однорідним волокнистим наповнювачем різної щільності, що значно збільшує пилоємність і термін служби фільтра при відносно низькому опорі повітряному потоку, високій ефективності фільтрації і малих габаритах фільтра. У цій конструкції сипучі шари розміщуються першими в напрямку потоку газу. Товщина першого шару вибирається в межах 50-60% від загальної товщини фільтра. Останній шар насадки робиться набагато щільнішим і має меншу товщину, що обмежує ефективність всього фільтра[6].

Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

До цього етапу висувуються найсуворіші вимоги. Тонке очищення повітря вимагає використання індивідуальних фільтрів, встановлених перед кожним ферментатором, які повинні очищати 99,999% повітря від частинок діаметром до 0,3 мікрона. Фільтрувальні матеріали, що використовуються в

цьому процесі очищення, а також все обладнання на виробничій лінії повинні регулярно стерилізуватися гострою парою[6].

Волокнисті матеріали зазвичай формуються у вигляді матів-плит з об'ємною часткою волокон близько 0,1%. Волокна утримуються разом завдяки тертю або сполучним речовинам. Базальтові волокна, скловата і синтетичні волокна (віскоза, перхлорвініл) є прикладами.

Волокнисті матеріали також можуть бути виготовлені у вигляді картону або паперу. Використовуються базальтові супертонкі волокна (БСТВ), бавовняний азбест, скло і сополімери вінілхлориду та акрилонітрилу. Картон або папір використовується для ущільнення килимка при заповненні фільтра.

Волокнисті матеріали недорогі, мають низький опір тиску води (0,01-0,03 МПа) і високу пилоємність, що робить їх досить перспективними в мікробіологічній промисловості.

Латексне просочення використовується для підвищення стійкості до різких випарів. Крім того, волокна просочені антибіотиками та бактерицидними сполуками, такими як гексахлорфен.

Для пористих матеріалів використовують полівініловий спирт, метали, кераміку та ацетилцелюлозу.

Цей тип фільтруючих матеріалів використовується в пластинчастих або циліндричних картриджах, має тривалий термін служби (1,5-2 роки) і добре працює при стерилізації парою. Коли повітря рухається через звивисті пори, відбувається інерція, дифузія та інші осадження.

Пластина з пористого матеріалу товщиною 1 см досить міцна і легко регенерується[6].

4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Одержання авермектину при вирощуванні штаму *S. avermitilis* Biok No. 04 проводять у середовищі, що містить такі компоненти, г/л[3]:

Кукурудзяний крохмаль – 149,57;

Дріжджовий екстракт – 8,92;

α -амілаза – 0,1;

Соєве борошно – 28;
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,022;
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,0023;
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,25;
 CoCl_2 – 0,02;
 CaCO_3 – 0,8.

З огляду на розрахунки, наведені у розділі 1, для вирощування інокуляту в колбах на качалці об'єм поживного середовища складає 1,6 л. Для цього підходить автоклав Panasonic (Японія) моделі MLS-3751L [13]. Об'єм даного автоклаву становить 50 л, габарити автоклаву 600 x 754 x 560 мм.



Рис. 4.2. Автоклав Panasonic (Японія).

Діапазон температур стерилізації становить 105-135 °С і контролюється мікропроцесорною системою. Поверхня автоклаву покрита ізоляційним покриттям[13].

Для культивування посівного матеріалу в колбах-качалках суміш, що містить кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт, соєве борошно та α -амілазу, стерилізують разом в автоклаві при 112°С протягом 30 хв. Композицію, що містить солі ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CoCl_2 , CaCO_3), стерилізують в окремій колбі при 131°С протягом 50 хв.

Для вирощування посівного матеріалу в 32-літровому інокуляторі готують композицію, що містить кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт, соєве борошно та α -амілазу, яку стерилізують при 112°C протягом 30 хвилин у 20-літровому збірнику. Компоненти середовища, представлені сіллю, готуються і стерилізуються разом в 32-літровому інокуляторі при 131°C протягом 1 години.

Для вирощування посівного матеріалу в 320-літровому інокуляторі готують композицію, що містить кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт, соєве борошно та α -амілазу, яку стерилізують при температурі 112°C протягом 30 хвилин у 200-літровому збірнику. Компоненти середовища, представлені сіллю, готуються і стерилізуються разом в 320-літровому інокуляторі при 131°C протягом 1 години.

Для виробничої культури авермектину у ферментері об'ємом 3,2 м³ готується суміш, що містить кукурудзяний крохмаль, дріжджовий екстракт, соєве борошно та α -амілазу, і стерилізується разом у збірнику об'ємом 2 м³ при температурі 112 °C протягом 30 хв. Компоненти середовища, представлені сіллю, готуються і стерилізуються разом у ферментері об'ємом 3,2 м³ при 131°C протягом 1 години.

Оскільки ферментер має об'єм 3,2 м³, стерилізація середовища здійснюється партіями.

Для доведення рН середовища до оптимального значення для культури бактерій, що продукують авермектин, готують 6% розчин HCl і 6% розчин гідроксиду натрію; розчин HCl не стерилізують і готують з 37% розчину HCl, тоді, як розчин NaOH стерилізують при 131°C протягом 40 хв.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведено в табл. 5.1.

Таблиця 3.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірний пристрій	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр попередньої очистки повітря.	1	Панельний фільтр касетного типу. Фільтруючий блок – синтетичний поліефір, рама – оцинкована сталь. Максимальна робоча температура 80 °С, максимальна швидкість потоку повітря – 5 м/с. Е = 80 %.[14]
К-3	Компресор	1	Повітродувка з магістральним пневмоприводом та приводним двигуном. Працює при тиску > 0,115 МПа, робочий тиск 0,4 – 1 МПа.[14]
ГФ-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінний апарат для охолодження повітря, що проходить через нього. Водяний поверхневий повітроохолоджувач типу «вода-повітря», у якому циркулює охолоджена вода.[14]
ГФ-5	Ресивер-вологовідділювач	1	Акумулятор пневмоенергії та згладжує пульсацію тиску. Обладнаний одним або декількома запобіжними клапанами і манометром. У ньому збільшується охолодження повітря та конденсується волога, яка видаляється через вентиль.[14]
ГФ-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Виконаний у вигляді металевого корпусу з оцинкованої сталі, зовні якого розташовані мідні трубки. В якості енергоносія – нагрітий пар. Для регулювання потужності: трьохходовий клапан, привід та каналний датчик температури.[14]
Ф-7	Головний повітряний фільтр	1	Набивний фільтр Гідромедпрому. Фільтруючий матеріал – базальтове волокно товщиною 0,5 – 1,0 мкм, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е = 90% [14]

НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ				
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розробив		Гайдамака		
Перевірів		Клосінько		
Затвердив		Стабніков		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Стадія	Аркуш
			37	Аркушів
			Кафедра БТМ	

1	2	3	4
Ф-8	Фільтр повітряний індивідуальний	1	Використовується фільтр ВНДФСа патронного типу з тканиною Петрянова (ацетилцелюлоза), що являє собою шар ультратонких волокон розміром 1,5 мкм нанесених на марлеву підкладку. Поверхнева щільність волокнистого шару 16 ± 3 г/м ³ . Температурний діапазон від -200 до +60 °С, продуктивність 1000 м ³ /рік, загальна площа фільтрування – 7,5 м ³ . E = 99,99%[14]
ГФ-9,10,11	Автоклав для стерилізації поживного середовища в колбах	3	Автоклав з вертикальним завантаженням Systec VX (Німеччина) об'ємом 5 л[17]
3-12	Збірник для приготування розчину HCl	1	Збірник із нержавіючої сталі (X18H10T) оснащений мішалкою. Об'єм 20 л.[16]
3-13	Збірник для приготування розчину HCl	1	Збірник із нержавіючої сталі (X18H10T) оснащений мішалкою. Об'єм 200 л.[16]
3-14	Збірник для приготування розчину NaOH	1	Збірник із нержавіючої сталі (X18H10T) Оснащений мішалкою, паровою сорочною, з нижнім спуском. Об'єм 5 л[16]
3-15	Збірник для приготування розчину NaOH	1	Збірник із нержавіючої сталі (X18H10T) Оснащений мішалкою, паровою сорочною, з нижнім спуском. Об'єм 50 л[16]
3-16	Збірник для приготування і стерилізації композиції I	1	Реактор-змішувач із нержавіючої сталі (X18H10T) Оснащений мішалкою, паровою сорочною, з нижнім спуском. Об'єм 20 л[16]
3-17	Збірник для приготування і стерилізації композиції I	1	Реактор-змішувач із нержавіючої сталі (X18H10T) Оснащений мішалкою, паровою сорочною, з нижнім спуском. Об'єм 200л[16]

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4
3-18	Збірник для приготування і стерилізації композиції I	1	Реактор-змішувач із нержавіючої сталі (X18H10T). Оснащений мішалкою, паровою сорочною, з нижнім спуском. Об'єм 2 м ³ [16]
3-19	Збірник для приготування і стерилізації композиції I	1	Реактор-змішувач із нержавіючої сталі (X18H10T) оснащений паровою сорочкою, манометром, термометром, рН-метром. Об'єм 20 м ³ [16]
3-20	Реактор-змішувач для приготування розчину каустичної соди	1	Збірник із нержавіючої сталі (X18H10T) об'ємом 30 м ³ . Оснащений мішалкою, паровою сорочною, з нижнім спуском[16]
3-21	Збірник для приготування розчину Бланідас еко-стерил	1	Збірник із нержавіючої сталі (X18H10T) оснащений мішалкою. Об'єм 500 л.[16]
ГФ-22	Качалка	1	Лабораторна механічна качалка. Швидкість перемішування регулюється реостатом опору або трансформатором, швидкість обертів качалки 120 об/хв[17]
ГФ-23	Інокулятор	1	Інокулятор із нержавіючої сталі (X18H10T) оснащений паровою сорочкою, пробовідбірником, барботером, манометром, термометром, рН-метром, трубою перетискування. Об'єм 30 л[16]
ГФ-24	Інокулятор	1	Інокулятор із нержавіючої сталі (X18H10T) оснащений паровою сорочкою, пробовідбірником, барботером, манометром, термометром, рН-метром, трубою перетискування. Об'єм 300 л[16]
ГФ-25	Інокулятор	1	Інокулятор із нержавіючої сталі (X18H10T) оснащений паровою сорочкою, пробовідбірником, барботером, манометром, термометром, рН-метром, трубою перетискування. Об'єм 3 м ³ [16]

1	2	3	4
ГФ-26	Ферментер для виробничого культивування	1	<p>ферментер Biostat STR® Generation 3 компанії «Sartorius».</p> <p>Характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Нержавіюча сталь AISI 316 для всіх поверхонь, що контактують із продуктом, AISI 304 - для поверхонь, що не контактують із продуктом. ✓ Співвідношення діаметра та висоти: 1: 2,5-3. ✓ Торосферичне дно без застійних зон. ✓ Діапазон робочих температур – від кімнатної температури +8°C до +60°C. Максимальна робоча температура – до 135°C. ✓ Підсвічування внутрішнього обсягу ферментера ✓ Перемішування – швидкість обертання мішалки 50 – 350 об/хв. (залежно від обсягу).[4]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Розділ 6: Опис технічної схеми

Технологічна схема біосинтезу евермектину *Streptomyces avermitilis* Біок № 04 включає допоміжні завдання (гігієна, підготовка стерильного повітря, підготовка титранту, підготовка живильного середовища та стерилізація) і технічні процеси (підготовка інокуляту та біосинтез цільового продукту).

ДР 1. Санітарна підготовка під час виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає медичні огляди, допуск до роботи, дотримання гігієнічних вимог до працівників, використання захисного одягу, навчання та управління знаннями.

ДР 1.2 Приготування миючих засобів, дезінфікуючих засобів, розчинів для чищення та дезінфекції

Необхідна кількість дезінфікуючих та миючих розчинів (каустична сода, Сульфонол) подається в колектор з об'ємного гравіметричного дозатора, встановленого в трубопроводі, змішується з водою і впорскується через об'ємний датчик; перемішування протягом 10 хвилин забезпечує розчин для очищення та дезінфекції обладнання та комунікацій.

ДР 1.2.1 Приготування розчину «Сульфонол»

«Сульфонол» використовується для дезінфекції. Для приготування 1% робочого розчину Сульфонолу візьміть 10 г порошку на 0,99 л води і розчиніть у збірнику (С-21); зважте на вагах 3 кг Сульфонолу; для приготування 30 л робочого розчину відкрийте кран подачі водопровідної води і ємність для збору на 500 л. з 297 літрами води (З-21). Відкрийте люк і завантажте Сульфонол в контейнер для збору (З-21). Запустіть мішалку і перемішуйте протягом 10 ± 1 хв до повного розчинення.

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ			
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Гайдамака			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Перевірів		Кпасінько					41	
Затвердив		Стабніков			Кафедра БТМ			

Відпрацьований розчин направляється в резервуар для нейтралізації стічних вод. Готовий розчин слід зберігати до 3 днів.

ДР 1.2.2. Приготування розчинів каустичної соди

Для приготування 2% розчину для миття візьміть 20 г соди на 0,98 л гарячої води. Для автоматичного миття використовують мийну машину. Зважують на терезах 400 кг каустичної соди. Відкривається вентиль подачі гарячої води $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ і подається $19,6\text{ м}^3$ води в збірник на 30 м^3 (З-20). Відкривається люк і завантажується каустична сода в збірник (З-20) через дозатор ємнісного вантажу. Запускається мішалка і перемішується протягом 10 ± 1 хв до повного розчинення. Нагрівається розчин до температури $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Відпрацьований розчин направляється в резервуар для нейтралізації стічних вод.

ДР 1.3: Підготовка приміщення

Підлоги, зовнішні поверхні обладнання, трубопроводів, устаткування та комунікацій, стіни та вхідні килимки миють 1% розчином Сульфонол. Генеральне прибирання проводиться раз на тиждень.

ДР 1.4. Підготовка обладнання

ДР 1.4.1 Очищення обладнання

Стерильні ємності, посівні матеріали та ферментери спочатку промивають водою протягом 2 хвилин, після чого воду переносять у резервуар для нейтралізації. Потім їх зрошують 2% розчином каустичної соди, нагрітим до 80°C , протягом 20-25 хвилин. Після миття промивається м'якою водою і переливається вода в резервуар для нейтралізації. Після очищення ферментера барботер продувають повітрям. Після огляду та ремонту вода знову промивається.

ДР 1.4.2. Стерилізація обладнання

Перед стерилізацією обладнання та комунікації промивають водою ($T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) з магістрального трубопроводу. Всі комунікації стерилізуються протягом 2 годин при надлишковому тиску $0,15 - 0,18\text{ МПа}$ і парі, що проходить через головний ферментер при температурі $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ферментер

стерилізують протягом 2 годин при надлишковому тиску 0,12 - 0,15 МПа. Після стерилізації пробовідбірник, продуктовий штуцер для засіву і лінія від ферментера до зливу обробляються паром протягом 30 хвилин. Пара повинна бути насиченою і сухою.

Для забезпечення і підтримки стерильності після стерилізації стерильне повітря подається у ферментер через барботер. Обов'язково підтримується надлишковий тиск 0,02-0,03 МПа (для запобігання забруднення сторонніми речовинами).

ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність

Ємнісне обладнання перевіряється на герметичність при тиску 0,05-0,07 МПа; якщо тиск (за манометром) не падає протягом 30 хвилин, обладнання вважається герметичним; якщо спостерігається падіння тиску на 0,001 МПа і більше, обладнання вважається герметичним і проводиться пошук місця витіку. Фланцеві з'єднання і зварні шви очищають розчином господарського мила під тиском повітря 0,05-0,07 МПа для перевірки на герметичність. Провіткі можуть свідчити про наявність бульбашок повітря.

ДР 2. Підготовка повітря для аерації та стерилізації

ДР 2.1 Забруднення атмосферного повітря

Забір повітря відбувається через повітрязабірник (ПЗ-1), розташований у зоні чистого повітря, подалі від технологічних вихлопів і витяжних систем. Водозабір знаходиться на висоті щонайменше 30 м над рівнем землі і закритий сталеву решіткою. Повітря проходить через всмоктувальну шахту під дією компресора (К-3) і потрапляє на фільтр грубого очищення (Ф-2).

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних частинок

Попередній фільтр видаляє з повітря великі фракції забруднень, які можуть пошкодити компресорне обладнання. Попереднє очищення від механічних забруднень (пилу та механічних частинок) відбувається у фільтрі попереднього очищення (Ф-2). Для цього використовується рукавний фільтр "Гідромедпром" (ефективність $E = 80\%$).

ДР 2.3 Перенесення та стабілізація термодинамічних параметрів повітря

Повітря стискається до 0,35 МПа в поршневому компресорі (К-3), температура підвищується до 120-250 °С за рахунок стиснення в компресорі і подається в теплообмінник (ГФ-4) для охолодження. Охолоджуюча вода, що подається в теплообмінник, використовується повторно. Стабілізація термодинамічних параметрів повітря є важливою, оскільки вологість повітря має значний вплив на ефективність очищення. Приймачі (Р-5) використовуються для стабілізації термодинамічних параметрів повітря.

Повітря подається з фільтра попереднього очищення (Ф-2) до теплообмінника-охолоджувача (ГФ-4) за допомогою компресора (К-3), який охолоджує повітря промисловою охолодженою водою. Потім він направляється в приймач-сушарку (Р-5), де видаляється конденсат. Потім повітря потрапляє в теплообмінник-нагрівач (Т-6), де воно піддається впливу пари низького тиску 0,2 МПа $T = 60$ °С, $W = 60\%$.

ДР 2.4. Очищення повітря в основному фільтрі

Попереднє очищення повітря від пилу та мікроорганізмів (розмір частинок > 1 мкм) здійснюється в основному фільтрі. Повітря потрапляє в основний повітряний фільтр (Ф-7). Фільтруючий матеріал являє собою багат шарову конструкцію з активованого вугілля та скловати.

Основний фільтр очищає повітря (ефективність $E = 90\%$).

ДР 2.5. Стерилізація повітря за допомогою індивідуальних фільтрів

Для остаточного очищення повітря перед ферментатором встановлюються індивідуальні повітряні фільтри (Ф-8). Картриджні фільтри з тканини Петрянова (ацетилцелюлоза) з ультратонкими волокнами в середньому 1,5 мкм, ламінованими на марлевій підкладці, використовуються як індивідуальні фільтри. Щільність волокнистого шару становить 16 ± 3 г/м² або 30 ± 5 г/м². Діапазон робочих температур від -200 до +60 °С. Частинки розміром до 0,1-0,2 мкм можуть затримуватися. Повітря стерилізується після проходження через тканину. Ефективність $E = 99,99\%$.

ДР 3: Приготування 6% розчину HCl для підкислення культури

ДР 3.1: Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при вирощуванні насіння в 30-літровому інокуляторі

У колбу на 250 мл під витяжною шафою наливають 101,5 мл дистильованої води і додають 18,5 мл 37 % розчину HCl при постійному перемішуванні піпеткою. Закриваємо колбу скляною пробкою.

ДР 3.2. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі на 300 л

У колбу на 2 л наливають 1,01 л дистильованої води під витяжною шафою і додають 185 мл 37 % розчину HCl при перемішуванні в циліндрі. Закриваємо колбу скляною пробкою.

ДР 3.3: Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 м³

Наливають 10,1 л питної води з мірної ємності в 20-літровий збірник (З-12), вмикають мішалку і додають 1,85 л 37 % розчину HCl.

ДР 3.4. приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища у ферментері об'ємом 30 м³

Наливають 101 л питної води в 200-літровий збірник (З-13) з об'ємним дозатором, запускають мішалку і додають 18,5 л 37 % розчину HCl.

ДР 4: Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації середовища

ДР 4.1 Приготування та стерилізація 6 % розчину NaOH для нейтралізації середовища під час вирощування посівного матеріалу в посівному резервуарі об'ємом 30 л

Зважують 1,8 г NaOH на терезах, переносять у колбу на 50 мл і додають 30 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 °C протягом 40 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація 6 % розчину NaOH для нейтралізації поживного середовища для посівного матеріалу в інкубаторі об'ємом 300 л.

Зважують 18 г NaOH на терезах, пересипають в колбу на 500 мл і доливають ще 300 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хвилин.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація 6 % розчину NaOH для нейтралізації середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 3 м³

180 г кристалічного NaOH за допомогою об'ємного дозатора подають у 5-літрову ємність (З-14), додають 3 літри питної води, вмикають мішалку і продовжують процес до повного розчинення NaOH. Отриманий лужний розчин стерилізують при 131°C протягом 40 хвилин.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації середовища у ферментерах об'ємом 30 м³

1,8 кг кристалічного NaOH засипають в 50-літрову ємність (З-15) через об'ємний дозатор, додають 30 літрів питної води, вмикають мішалку і продовжують обробку до повного розчинення NaOH. Отриманий лужний розчин стерилізують при 131°C протягом 40 хвилин.

ДР 5: Підготовка та стерилізація поживних середовищ

ДІ 5.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 1,5-літрових качалок

Вміст компонентів для приготування 1,5 л живильного середовища наведено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,5 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 1,5 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	149,57	224,3	I	1
Дріжджовий екстракт	8,92	13,4		
α -амілаза	0,1	0,15		
Соєве борошно	28	42		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,022	0,033	II	0,5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0023	0,0034		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,25	0,4		
CoCl_2	0,02	0,03		
CaCO_3	0,8	1,2		

ДР 5.1.1. Підготовка та стерилізація композиції I

Зважують 224,3 г кукурудзяного крохмалю, 13,4 г дріжджового екстракту, 0,15 г α -амілази та 42 г соєвого борошна на терезах. Наважки переносять у 2-літрову колбу, додають 1 л питної води та перемішують. Закривають колбу з розчином ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112°C протягом 30 хвилин.

ДР 5.1.2 Приготування та стерилізація композиції II

Зважують на терезах зразок солі: 0,033 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0034 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,4 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,03 г CoCl_2 , 1,2 г CaCO_3 . Переносять наважки в колбу на 1 л, додають 500 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу з розчином солі ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 50 хвилин.

ДР 5.2. Підготовка середовища для вирощування посівного матеріалу в 30-літровому інокуляторі

На цьому етапі слід підготувати 15 літрів живильного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 15 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 15 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	149,57	2243	I	10
Дріжджовий екстракт	8,92	134		
α -амілаза	0,1	1,5		
Соєве борошно	28	420		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,022	0,33	II	5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0023	0,034		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,25	4		
CoCl_2	0,02	0,3		
CaCO_3	0,8	12		

ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції I

Зважують 2243 г кукурудзяного крохмалю, 134 г дріжджового екстракту, 1,5 г α -амілази та 420 г соєвого борошна на технічних вагах. Наважки переносять у 20-літровий колектор (З-16) і подають 10 літрів питної води з об'ємного дозатора. Для забезпечення повного розчинення компонентів в корпус колектора подається пара і вмикається перемішувач для підвищення температури розчину до 40°C, після чого в пристрій подається гостра пара для стерилізації при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції II

Зважують на терезах наважки солей: 0,33 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,034 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 г CoCl_2 , 12 г CaCO_3 . Переносять зразок у 30-літрову чашку для посіву (ГФ-23) і додають 5 літрів питної води у волюмному дозаторі. Для повного розчинення солей в корпус апарату подається пара, яка підвищує температуру розчину до 40 °C, і вмикається мішалка. Стерилізація здійснюється шляхом подачі гострої пари при температурі 131 °C протягом 1 години.

ДР 5.3 Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в 300-літровому інокуляторі

На цьому етапі необхідно підготувати 150 літрів живильного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в таблиці 6.3.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 150 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 150 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	149,57	22430	I	100
Дріжджовий екстракт	8,92	1340		
α -амілаза	0,1	15		
Соеве борошно	28	4200		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,022	3,3	II	50
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0023	0,34		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,25	40		
CoCl_2	0,02	3		
CaCO_3	0,8	120		

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції I

22,4 кг кукурудзяного крохмалю, 1,3 кг дріжджового екстракту, 15 г α -амілази та 4,2 кг соєвого борошна зважують на технічних вагах. Наважки переносять у 200-літровий колектор (З-17) і подають 100 літрів питної води з об'ємного дозатора. Для забезпечення повного розчинення компонентів в корпус колектора подається пара, вмикається пристрій для перемішування і температура розчину підвищується до 40°C, після чого в пристрій подається гостра пара для стерилізації при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

ДР 5.3.2 Приготування та стерилізація композиції II

Зважують на терезах наважки солей: 3,3 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,34 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 40 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 г CoCl_2 , 120 г CaCO_3 . Переносять зразок в 300-літрову чашу для посіву (ГФ-24) і додають 50 л питної води в об'ємному дозаторі. Для забезпечення повного розчинення солей в корпус обладнання подається пара для підвищення температури розчину до 40 °C і вмикається мішалка.

Стерилізація здійснюється шляхом подачі гострої пари в пристрій при температурі 131 °С протягом 1 години.

ДР 5.4. Підготовка середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 м³

На цьому етапі необхідно підготувати 1500 літрів живильного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в таблиці 6.4.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1500 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 1500 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний крохмаль	149,57	224,3	I	1000
Дріжджовий екстракт	8,92	13,4		
α-амілаза	0,1	0,15		
Соєве борошно	28	42		
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,022	0,33	II	500
MnSO ₄ H ₂ O	0,0023	0,0034		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25	0,4		
CoCl ₂	0,02	0,03		
CaCO ₃	0,8	1,2		

ДР 5.4.1. Приготування та стерилізація композиції I

Компоненти композиції зважуються за допомогою об'ємного вагового дозатора і подаються в колектор (З-18) об'ємом 2 м³. 224,3 кг кукурудзяного крохмалю, 13,4 кг дріжджового екстракту, 0,15 кг α-амілази та 42 кг соєвого борошна; 1 м³ питної води подається в об'ємний ваговий дозатор. Для забезпечення повного розчинення інгредієнтів в корпус колектора подається пара, вмикається мішалка і температура розчину підвищується до 40°С, після чого в обладнання подається гостра пара для стерилізації при температурі 112°С протягом 30 хвилин.

ДР 5.4.2 Приготування та стерилізація композиції II

Зважують на терезах наважки солей: 0,33 кг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0034 кг $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,4 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,03 кг CoCl_2 , 1,2 кг CaCO_3 . Переносять зразок в інокулятор об'ємом 3 м³ (ГФ-25) і подайте 500 л питної води за допомогою ємнісного дозатора. Для забезпечення повного розчинення солей в корпус апарату подається пара для підвищення температури розчину до 40 °С і вмикається мішалка. Стерилізація здійснюється шляхом подачі гострої пари при температурі 131 °С протягом 1 години.

ДР 5.5. Підготовка поживних середовищ для отримання життєздатних бактерій у ферментері об'ємом 30 м³

На цьому етапі слід підготувати 15 м³ поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в таблиці 6.5.

Таблиця 6.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 15 м³ поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 1500 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, м ³
Кукурудзяний крохмаль	149,57	2243	I	10
Дріжджовий екстракт	8,92	134		
α -амілаза	0,1	1,5		
Соєве борошно	28	420		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,022	3,3	II	5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0023	0,034		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,25	4		
CoCl_2	0,02	0,3		
CaCO_3	0,8	12		

ДР 5.5.1. Приготування та стерилізація композиції I

За допомогою об'ємного вагового дозатора інгредієнти композиції зважуються і подаються в колектор (3-19) об'ємом 20 м³. 2243 кг кукурудзяного крохмалю, 134 кг дріжджового екстракту, 1,5 кг α -амілази та 420 кг соєвого борошна, а потім 10 м³ питної води в об'ємному

гравіметричному дозаторі. Для забезпечення повного розчинення інгредієнтів в корпус колектора подається пара, вмикається мішалка і температура розчину підвищується до 40°C, після чого в обладнання подається гостра пара для стерилізації при температурі 112°C протягом 30 хвилин.

ДР 5.5.2 Приготування та стерилізація композицій II

За допомогою об'ємного дозатора відважують 30 мЗ (ГФ-26) солі і подають у ферментер: 3,3 кг Na₂MoO₄ 2H₂O, 0,034 кг MnSO₄ H₂O, 4 кг (NH₄)₂SO₄, 0,3 кг CoCl₂ і 12 кг CaCO₃. Потім 5 мЗ питної води подається об'ємною самопливною лійкою. Для забезпечення повного розчинення солей в корпус апарату подається пара для підвищення температури розчину до 40 °С і вмикається мішалка. Стерилізація здійснюється подачею гострої пари при 131 °С протягом 1 години.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури Streptomyces avermitilis Biok № 04

Зібрані культури штамів S. avermitilis Biok № 04 зберігають при 4°C у пробірках зі скошеним МПА і пересівають кожні 3-4 місяці. При роботі з зібраними культурами дотримуються суворих асептичних умов.

ТП 6.2. Приготування Streptomyces avermitilis Biok № 04 на агаровому середовищі

Зібрані культури, що зберігаються в пробірках МПА, пересівають на чашки Петрі з агаризованим м'ясопептонним середовищем в асептичних умовах для формування ізолюваних колоній; інкубують при 28°C протягом 7 днів (168 годин).

ТП 6.3. Вирощування робочих культур Streptomyces avermitilis Biok № 04 на агаровому середовищі

За допомогою мікробної петлі переносять одну ізолювану колонію в пробірку зі скошеним м'ясним пептонним агаризованим середовищем. Робочі культури інкубують у пробірках при 28°C протягом 7 днів (168 годин).

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах за допомогою качалки

У колбу на 2 л, в стерильних умовах, поміщають 1 л розчину Композиції I (з ДР 5.1.1) і додають 500 мл розчину Композиції II (з ДР 5.1.2). Перемішують розчин і розливають 112,5 мл у 13 стерильних колб об'ємом 750 мл.

Додають 11,2 мл фізіологічного розчину в пробірку з *S. avermitilis* Biok № 04 (з ТП 6.3), перемішують і додають по одній пробірці в колбу з живильним середовищем. Культивування продуцентів авермектину проводять у колбах на качалці (120 об/хв) при 28°C протягом 40 годин.

В кінці інкубації відбираються зразки для мікробіологічного контролю.

Після завершення культивування здійснюють відбір проб для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 6.5. Вирощування насіння в 30-літровому інокуляторі

Посіяти в 30-літровий інокулятор (ГФ-23) Компонентом II (з ДР 5.2.2) разом з Компонентом I (з ДР 5.2.1). Потім посівний матеріал ТР 6.4 подається у висівну колбу, вмикається мішалка, аерація та пара в корпусі висівного апарату. Необхідне значення рН середовища підтримується на заданому рівні 7,0-7,2 за допомогою 6% розчину HCl (ДР 3.1) і 6% розчину NaOH (ДР 4.1).

Інкубацію проводять при температурі 282°C, рН 7,0-7,2, швидкості перемішування 120 об/хв і швидкості споживання кисню 18,5 ммоль/л/год протягом 40 год. Зразки відбирають кожні 3-4 год для мікробіологічного контролю.

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в 300-літровому інокуляторі

Посіяти в 300-літровий інокулятор (GF-24) Компонентом II (з РР 5.3.2) разом з Компонентом I (з РР 5.3.1). Потім посівний матеріал ТР 4.5 подається через компресійну трубку, вмикається змішувальний пристрій, аерація та пара для подачі пари в корпус висівного апарату. Необхідне значення рН середовища підтримується на заданому рівні 7,0-7,2 за допомогою 6% розчину HCl (TS 3.2) і 6% розчину NaOH (TS 4.2).

Інкубація проводиться при температурі 282°C, рН 7,0-7,2, швидкості перемішування 120 об/хв і споживанні кисню протягом 40 годин.

ТП 6.7. Посівний матеріал в інокуляторах по 3 м³

Компонент II (з ДР 5.4.2) вносять в інокулятор (ГФ-25) об'ємом 3 м³ разом з компонентом I (з ДР 5.4.1). Потім насіння ТП 6.6 подається через

компресійну трубку, вмикається змішувальний пристрій, аерація і пара, і пара подається в корпус висівного апарату. Необхідне значення рН середовища підтримується на заданому рівні 7,0-7,2 за допомогою 6% розчину HCl (ДР 3.3) і 6% розчину NaOH (ДР 4.3).

Інкубація проводиться при температурі 282°C, рН 7,0-7,2, швидкості перемішування 120 об/хв і швидкості споживання кисню 18,5 ммоль/л/год протягом 40 год. Зразки відбираються кожні 3-4 год для мікробіологічного контролю.

ТП 7. Біосинтез.

ТП 7.1. Виробнича культура у ферментері об'ємом 30 м³

Суміш II (з ДР 5.5.2) подають у ферментатор об'ємом 30 м³ (ГФ-26) разом зі сумішшю I (з ДР 5.5.1). Потім насіння з (ТП 6.7) подається через компресійну трубку, вмикається змішувальний пристрій, аерація та пара, і пара подається в корпус висівного апарату. Необхідне значення рН середовища підтримується на заданому рівні 7,0-7,2 за допомогою 6% розчину HCl (ДР 3.4) і 6% розчину NaOH (ДР 4.4).

Інкубацію проводять при температурі 282°C, рН 7,0-7,2, швидкості перемішування 120 об/хв і споживанні кисню 18,5 ммоль/л/год протягом 10 днів (240 год). Під час біосинтезу зразки культурального середовища відбирають кожні 8 годин для моніторингу параметрів росту і синтезу, а також для мікробіологічного контролю.

Наприкінці культивування (240 год) визначають параметри біосинтезу, такі як концентрація евермектину ($C_c = 5-5,56$ г/л).

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу

Контроль виробництва здійснюється з метою одержання якісного продукту, що відповідає представленим вище вимогам. Основні точки, параметри контролю та межі їх змін подані в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Таблиця точок контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1. <i>Підготовка персоналу</i> Км 1.1	Руки персоналу, мікробна контамінація	Мікробіологічний	Змиви тампонами 2-а рази в тиждень впродовж роботи і 1-н раз у 2-а тижні після обробки дез. засобами	Після дез. Обробки – не повинні містити м-о. У процесі роботи – не більше 5 КУО у змивах з рук одного працюючого
ДР 1.2.1. <i>Приготування розчину «Сульфонул» 1%</i> Кт 1.2.1	Сульфонол, кількість сульфонолу	Ваги, мірний посуд, кількісні методи оцінки концентрації	Кожну операцію	1%
ДР 1.2.2. <i>Приготування розчину каустичної соди 2%</i> Кт 1.2.2	Каустична сода, кількість каустичної соди	Ваги, мірний посуд, фізичні методи оцінки концентрації	Кожну операцію	2%
ДР 1.3. <i>Підготовка виробничих приміщень</i> Км 1.3	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 300/см ²

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ			
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Гайдамака				РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Перевірів	Княгінько						55	
Затвердив	Стабніков				Кафедра БТМ			

1	2	3	4	5
ДР 2.1 <i>Забір повітря</i> Кт.2.1	Повітря з атмосфери, кількість частинок	Пропускна здатність повітрязабірника	Кожну операцію	2000 частинок /м ³
ДР 2.2. <i>Очистка повітря від пилу і механічних домішок</i> Кт 2.2.	Повітря, ступінь чистоти повітря	Ефективність очистки повітря	Кожну операцію	E=80%
ДР 2.3. <i>Транспортування і стабілізація термодинамічних показників повітря</i> Кт 2.3.	Тиск, температура та вологість повітря	Манометр, Термометр, вологомір	Кожну операцію	0,2 МПа, 60 °С, 60%
ДР 2.4. <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i> Кт 2.4., Км 2.4.	Повітря, вміст мікроорганізмів та часток	Метод визначення Мікробної контамінації (проба повітря КУО/м ³), седиментація	Кожної зміни, під час культивування	< 2 КУО/м ³ , max = 200 часток/м ³ , E=90%
ДР 2.5. <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i> Кт 2.5., Км 2.5.	Повітря, ефективність очистки, вміст мікроорганізмів та часток	Проба повітря, часточки бруду	Безперервно при подачі повітря	E=99,99%, max = 10 часток/м ³ , не має життєздатних мікроорганізмів
ДР 4.1 <i>Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживного середовища у ферментері об'ємом 30 л</i> Кт 4.1, Км 4.1	Температура, стерильність, час витримки,	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура визначається впродовж процесу стерилізації, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль	T=131°C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
<p>ДР 4.2 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживного середовища у ферментері об'ємом 300 л Кт 4.2, Км 4.2</p>	<p>Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура оцінюється протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=131°C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>ДР 4.3 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживного середовища у ферментері об'ємом 3 м³ Кт 4.3, Км 4.3</p>	<p>Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура визначається протягом стерилізації, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль</p>	<p>T=131°C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>ДР 4.4 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживного середовища у ферментері об'ємом 30 м³ Кт 4.4, Км 4.4</p>	<p>Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура оцінюється протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=131°C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>ДР 5.1.1 Приготування та стерилізація композиції I Кт 5.1.1, Км 5.1.1</p>	<p>Композиція I Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура визначається Протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>

1	2	3	4	5
<p>ДР 5.1.2 <i>Приготування та стерилізація композиції II</i> Кт 5.1.2 Км 5.1.2</p>	<p>Композиція II Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура визначається протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=131°C, τ = 50 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>ДР 5.2.1 <i>Приготування та стерилізація композиції I</i> Кт 5.2.1 Км 5.2.1</p>	<p>Композиція I Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура визначається протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>ДР 5.2.2 <i>Приготування та стерилізація композиції II</i> Кт 5.2.2 Км 5.2.2</p>	<p>Композиція II Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура визначається протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=131°C, τ = 1 год, відсутність мікробіоти</p>
<p>ДР 5.3.1 <i>Приготування та стерилізація композиції I</i> Кт 5.3.1 Км 5.3.1</p>	<p>Композиція I Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура визначається протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>ДР 5.3.2 <i>Приготування та стерилізація композиції II</i> Кт 5.3.2 Км 5.3.2</p>	<p>Композиція II Температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Температура визначається протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>T=131°C, τ = 1 год, відсутність мікробіоти</p>

продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
ДР 5.4.1 <i>Приготування та стерилізація композиції I</i> Кт 5.4.1 Км 5.4.1	Композиція I Температура, час стерилізації, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура визначається протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T=112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 5.5.2 <i>Приготування та стерилізація композиції II</i> Кт 5.4.2 Км 5.4.2	Композиція II Температура, час стерилізації, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура визначається Впродовж стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T=131°C, τ = 1 год, відсутність мікробіоти
ДР 5.5.1 <i>Приготування та стерилізація композиції I</i> Кт 5.5.1 Км 5.5.1	Композиція I Температура, час стерилізації, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура визначається впродовж стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T=112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 5.5.2 <i>Приготування та стерилізація композиції II</i> Кт 5.5.2 Км 5.5.2	Композиція II Температура, час стерилізації, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Температура визначається впродовж стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	T=131°C, τ = 1 год, відсутність мікробіоти
ТП 6.1 <i>Підтримання колекційної культури Streptomyces avermitilis Biok No. 04</i> Км 6.1	Бактеріальний штам <i>S. avermitilis</i> Biok No. 04, морфологія, культуральні ознаки, мікробіологічна чистота	Мікроскопіювання	Кожний цикл	Відповідність розміру, форми клітин; країв, колір та прозорість колонії, відсутність сторонньої мікрофлори

продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
<p>ТП 6.2 Одержання <i>Streptomyces avermitilis</i> Віок No. 04 на агаризованом у середовищі Кт 6.2., Км 6.2.</p>	<p>Температура, час, мікробіологіч на чистота культури, морфологія</p>	<p>Термометр, годинник, забір проби, мікробіологічний метод, мікроскоп</p>	<p>Протягом процесу</p>	<p>28°C, 7 діб (168 год), відсутність сторонньої мікрофлори, відповідна морфологія</p>
<p>ТП 6.3 Вирощування робочої культури <i>Streptomyces avermitilis</i> Віок No. 04 на агаризованом у середовищі Кт 6.3, Км 6.3.</p>	<p>Температура, час, мікробіологіч на чистота культури, морфологія</p>	<p>Термометр, годинник, забір проби, мікробіологічний метод, мікроскоп</p>	<p>Протягом процесу</p>	<p>28°C, 7 діб (168 год), відсутність сторонньої мікрофлори, відповідна морфологія</p>
<p>ТП 6.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках Кт 6.4., Км 6.4.</p>	<p>Посівний матеріал, Тривалість вирощування, частота обертів качалки, температура, мікробіологіч на чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Протягом процесу</p>	<p>t = 28 °C, τ = 40 год, ω = 120 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
<p>ТП 6.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л Кх 6.5. Кт 6.5. Км 6.5.</p>	<p>Поживне середовище в Інокуляторі, рН Посівний матеріал, тривалість вирощування, кратність подачі повітря, температура, надлишковий тиск, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури морфологічна відповідність організмів.</p>	<p>Датчик рН годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп.</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі</p>	<p>рН=7,0-7,2 t = 28±2°C, τ =40 год, ω = 120 об/хв, 18,5 ммоль/л/год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>ТП 6.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л Кх 6.6. Кт 6.6. Км 6.6.</p>	<p>Поживне середовище в Інокуляторі, рН Посівний матеріал, тривалість вирощування, кратність подачі повітря, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури морфологічна відповідність організмів.</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр, манометр, технічний, тахометр, витратомір, мікроскоп.</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання здійснюють в кінці процесу.</p>	<p>рН=7,0-7,2 t = 28±2°C, τ =40 год, ω = 120 об/хв, 18,5 ммоль/л/год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

закінчення табл. 7.1

1	2	3	4	5
<p>ТП 6.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 м³ Кх 6.7. Кт 6.7. Км 6.7.</p>	<p>Поживне середовище в Інокуляторі, рН Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури морфологічна відповідність організмів.</p>	<p>Датчик рН, годинник, витратомір, термометр, технічний, тахометр, манометр, мікроскоп.</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання здійснюють в кінці процесу.</p>	<p>рН=7,0-7,2 t = 28±2°C, τ =40 год, ω = 120 об/хв, 18,5 ммоль/л/год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 м³ Кт 7.1. Км 7.1.</p>	<p>Поживне середовище в ферментері, рН, Культуральна рідина температура, час, аерація, перемішування, витрати повітря та води, фаза росту, мікробіологічна чистота, герметичність, концентрація КУО в кінці культивування</p>	<p>Регулятор температур, годинник, мікрокалориметр, витратомір, рН-метр, мікроскоп, забір проби, манометр, фотоколориметр.</p>	<p>Протягом процесу</p>	<p>рН=7,0-7,2 t = 28±2°C, τ =10 діб (240 год) год, ω = 120 об/хв, 18,5 ммоль/л/год, відсутність сторонньої мікробіоти C_a = 5-5,56 г/л</p>

7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль використовується для встановлення мікробіологічної чистоти та морфологічної однорідності посівного матеріалу і проводиться шляхом розливу суспензії спор у чашки Петрі, що містять суцукро-агар (СА) та м'ясо-пептонний агар (МПА).

Для аналізу беруть спори вагою до 35 мг і висівають у 80-90 чашок Петрі з СА та 10-20 чашок з 1 МПА. Досліджуваний споровий матеріал розводять до щільності росту щонайменше 40-60 колоній на чашку.

Чашки з СА термостатують при 32°C протягом 5-6 днів, а чашки з МПА - при 37°C протягом 1-2 днів. Їх оглядають на 4-й і 6-й день після посіву, щоб перевірити однорідність культури (відсутність варіацій штамів) і чистоту (відсутність бактерій, дріжджів або кольорових пліснявих грибів); посівний матеріал бракують, якщо виявлено більше 0,2% варіацій штамів або сторонніх мікроорганізмів[23].

Мікроскопія проводиться під оптичним мікроскопом з імерсійною системою. Метод приготування передбачає нанесення невеликої краплі культурального середовища на чисте, стерильне, знежирене предметне скло за допомогою стерильної петлі. Краплі розподіляються на склі за допомогою петлі (діаметр мазка становить приблизно 1 см). Мазок сушать при кімнатній температурі, без нагрівання, до повного випаровування води. Потім скляною паличкою наносять одну-дві краплі імерсійної олії на висохлий підготовчий мазок. Олію, що залишилася на імерсійній лінзі, видаляють ваткою, змоченою етиловим спиртом [24].

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають опосередковано за оптичною густиною клітинної суспензії і переводять у суху біомасу за допомогою калібрувальної кривої.

Для контролю відбирають 0,5 мл культурального середовища, розводять у 10 разів стерильною питною водою і вимірюють у кюветі товщиною 2,5 мм

за допомогою спектрофотометра з оптичним фільтром при довжині хвилі $\lambda = 590$ нм[25-26]. Як референтний розчин використовується стерильне середовище, розведене в 10 разів у стерильній питній воді. Результати, отримані на спектрофотометрі, множать на коефіцієнт 20, щоб врахувати швидкість розведення і довжину кювети. Отримані значення переводяться в суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

7.3.2. Концентрація цільового продукту

Концентрацію авермектину В1а можна визначити методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) після центрифугування 10 мл культурального середовища при 3000 об/хв протягом 10 хв[3].

Елююють за атмосферних умов на колонці Novapak C18 (Waters Ltd, США: 3,9-9,150 мм) зі співвідношенням метанол:вода 85:15 (% , об:об) при швидкості потоку 0,8 мл/хв.

Додають до зразка рівний об'єм метанолу, струшують протягом 30 хвилин, щоб витягти авермектин з міцелію, тестують 10 мкл метанольного екстракту при довжині хвилі 246 нм і використовують автентичний зразок авермектину в якості стандарту.



Рис. 7.1. Колонка Novapak C18 (Waters Ltd, США) [31].

7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Кукурудзяний крохмаль перетворюється на глюкозу за допомогою α -амілази, тому вміст джерела вуглецю можна визначити за методом, описаним в[27].

Цей метод використовує той факт, що відновлювальні цукри окислюються при додаванні 3,5-динітросаліцилової кислоти (DNS) і нагріванні в лужному середовищі, після чого виявляється забарвлення. Виявляється колір окисленого відновлювального цукру.

Культуральне середовище центрифугують при 13800 об/хв протягом 5 хвилин при 4°C. Надосадову рідину змішують з рівним об'ємом 20% трихлороцтової кислоти та інкубують при кімнатній температурі протягом 5 хв. Потім знову центрифугують при 13800 об/хв протягом 5 хв. Відфільтровують надосадову рідину через бактеріальний фільтр з розміром пор $\phi = 0,22$ мкм.

Надосадову рідину змішують з 1/5 об'єму 20% розчину гексадецилтриметиламоній броміду, інкубують при 65°C протягом 10 хв і центрифугують при 13800 об/хв протягом 10 хв. Таким чином виходить заздалегідь підготовлений зразок.

Одну аліквоту попередньо обробленого зразка обробляють 3,5-динітросаліциловою кислотою в лужному середовищі і визначають концентрацію редуруючих цукрів. Розводять попередньо оброблений зразок у 10 разів водою. Змішують розчинник (200 мкл) з 3,5-динітросаліциловою кислотою (600 мкл) та інкубують при 100 °C протягом 10 хв. Після охолодження до кімнатної температури переносять 200 мкл у 96-лунковий планшет. Поглинання суміші вимірюється при 550 нм.

Концентрацію редууючих цукрів у попередньо обробленому зразку розраховують за оптичною густиною отриманої суміші, виміряною при 550 нм методом 3,5-динітросаліцилової кислоти зі стандартної кривої глюкоза-3,5-динітросаліцилова кислота[27].

Визначення концентрації джерела азоту

У культуральному середовищі авермектину джерелом азоту є соєве борошно, тому концентрацію органічного азоту можна визначити за допомогою методу, описаного в[28].

Розчинений органічний азот можна виміряти шляхом каталітичного окислення відфільтрованого і підкисленого зразка культурального середовища при високій температурі ($>700^{\circ}\text{C}$). Повітря пропускають через зразок, і всі розчинені сполуки азоту, які не вдалося видалити повітрям, спалюють і перетворюють на оксид азоту, який потім охолоджують і детектують за допомогою хемілюмінесценції в газовій фазі, щоб отримати значення загального розчиненого азоту. Значення розчиненого органічного азоту розраховується як різниця між загальним розчиненим азотом і сумою всього розчинного неорганічного азоту.

Метод вимірювання.

1. Пропалення флакону і фільтрування при 450°C протягом 4 годин, щоб відфільтрувати зразок, і дати охолонути до кімнатної температури перед використанням.

2. Готують 2 моль/л розчин HCl , розчинивши 33,2 мл концентрованої HCl в очищеній воді та додавши до об'єму 200 мл.

3. Відфільтровують зразок за допомогою шприца та шприцевого фільтра. Перед фільтруванням промивають шприц зі зразком. Зливають перші 5 мл фільтрату і відбирають 20 мл у скляний флакон.

4. Додають у флакон 80 мкл 2 моль/л HCl .

5. Закривають кришкою і ставлять флакон у холодильник.

6. Готують початковий стандартний розчин, що містить 1000 мг азоту/л, розчинивши 4,716 г сульфату амонію в очищеній воді та додавши до об'єму 1 л.

7. Під час вимірювання готують відповідний робочий стандарт (наприклад, 0-1 мг/л) для калібрування аналізатора. Готують розчин проміжного стандарту 100 мг/л з вихідного розчину, вносять відповідну кількість цього розчину і 2 моль/л розчину соляної кислоти робочого

стандарту в мірну колбу і заповнюють очищеною водою. Калібрувальні стандартні розчини готуються щотижня.

8. Заповнюють кожен калібрувальний флакон приблизно на $1/2 - 2/3$, накривають поліетиленовою плівкою і проколюють голкою шприца.

9. Готують аналізатор загального розчиненого азоту до аналізу відповідно до інструкції з експлуатації.

10. Завантажують стандартний зразок в автоматичний пробовідбірник аналізатора і запускають стандарт для калібрування TDS і тестування лінійності.

11. В день аналізу дістають зразок з холодильника і дають йому охолонути до кімнатної температури.

12. Переміщують зразок в ультразвукову камеру на 10 хвилин.

13. Знімають кришку, накривають поліетиленовою плівкою і проколюють голкою.

14. Аналізують зразок за допомогою аналізатора. Переконаються в правильності роботи приладу, використовуючи стандарт (еталонну воду або еквівалент), і включають зразок обробленої води в цикл.

15. Розраховують значення розчиненого органічного азоту як різницю між загальним розчиненим азотом і сумою всіх розчинених форм неорганічного азоту[28].

Аналіз за допомогою хемілюмінесценції має низку переваг над іншими методами, включаючи високу чутливість, широкий діапазон концентрацій, простоту обладнання та економічність. Хемілюмінесценція широко використовується в екологічному моніторингу, клінічній діагностиці та біотехнології як чутливий, швидкий і простий аналітичний метод[29].

Точність хемілюмінесцентних методів становить 54%[30].

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Представлена технологія виробництва евермектину включає допоміжні завдання (гігієна, підготовка стерильного повітря, підготовка титранту, підготовка живильного середовища та стерилізація) і технічні процеси, включаючи підготовку посівного матеріалу та біосинтез цільового продукту.

1. Гігієнічна підготовка під час виробництва

Цей етап включає щоденне прибирання з використанням миючого засобу «Сульфол» і розчину каустичної соди. Скидання стоків у каналізаційну систему.

Велике обладнання миється в сірчаноокислотній мийці з використанням миючого засобу Сульфол. Після очищення рідкі відходи можна зібрати і використати повторно, а промивна вода зливається в каналізацію. На цьому етапі утворюється велика кількість рідких відходів.

2. Підготовка та стерилізація поживних середовищ для інокуляції та отримання життєздатних бактерій

Перед приготуванням носія сировину перевіряють і відбраковують, якщо вона не відповідає специфікаціям. На цьому етапі упаковки від сировини також є стандартними твердими відходами. Отже, цей етап є джерелом твердих відходів.

3. Посівний матеріал і його підготовка

На цьому етапі посівний матеріал розвивається в інокулятах. Відходи посівного матеріалу необліковуються, оскільки він використовується для засіву наступного ферментера.

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ			
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Гайдамака			РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Перевірів		Красінько					68	
Затвердив		Стабніков						
						Кафедра БТМ		

Оскільки *Streptomyces avermitilis* Biok № 04 є аеробним організмом, ефективне постачання розчиненого кисню є важливою частиною процесу культивування. У той же час, оскільки стерильність є необхідною умовою для глибокого вирощування продуцента, повітря, що подається для аерації, має бути стерильним, а під час вирощування утворюється велика кількість відпрацьованого повітря. Крім того, виробники є спороутворюючими мікроорганізмами, і відпрацьоване повітря буде містити їх спори. На цьому етапі відбувається викид великої кількості газоподібних відходів.

4. Виробничий біосинтез

На цьому етапі *Streptomyces avermitilis* Biok № 04 культивують для отримання евермектину з живильного середовища, але відпрацьоване повітря після аерації буде містити спори. На цьому етапі рідкі відходи не враховуються, оскільки культуральне середовище збирається в колектор після завершення біосинтезу і до відділення бажаного продукту. На цьому етапі відбувається скидання великої кількості газоподібних відходів.

Розрахунок обсягів рідких відходів. Для поточного очищення готується розчин «Сульфонол» з концентрацією 1%: за один виробничий цикл (152 години - 6 днів) витрачається 760 літрів робочого розчину «Сульфонол», який після очищення зливається в каналізацію. В мийці SIR «Сульфонол» використовується для миття, з об'ємом відходів 11365 літрів за одне очищення. Миючий засіб «Сульфонол» безпечний для навколишнього середовища завдяки IV класу безпеки. Загальний опис рідких відходів виробництва авермектину наведено у *табл. 8.1*.

Таблиця 8.1

Характеристика рідких відходів під час виробництва авермектину

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (л)	Клас небезпеки
1 % розчин «Сульфол»	перкарбонат натрію, тетраацетилендіаміну, лимонна кислота, стабілізатори, інгібітори корозії	11365	IV

Розрахунок об'єму твердих відходів. Під час гігієнічної підготовки виробництва та приготування поживного середовища посилення біохімічних процесів в аеробному біореакторі твердих побутових відходів забезпечується процесом очищення стічних вод, який відбувається по всьому об'єму біореактора, а також рівномірним розподілом стічних вод через перфоровані трубопроводи в нижній частині споруди. Розподільні трубопроводи розташовані таким чином, що вода рівномірно розподіляється по всій конструкції. Таке розташування розподільчих труб запобігає потраплянню неочищених стічних вод у вихідний отвір очисних споруд постійного струму. Він також забезпечує стабільну роботу аеробного біореактора, навіть якщо у стічних водах присутні небезпечні речовини або залпові викиди.

Таблиця 8.2

Характеристика твердих відходів під час виробництва авермектину

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Упаковка «Сульфолол», кукурудзяного крохмалю та дріжджового екстракту	Мішковий папір (марка БМ)	18,9	IV
Упаковка компонентів поживного середовища	Полівінілхлорид (PVC-3)	0,98	IV
Біомаса	Біомаса культури <i>Streptomyces avermitilis</i> Biok No. 04	187	IV
Всього		206,9	

Розрахунок об'ємів газоподібних відходів. Газоподібні відходи утворюються на етапах підготовки насіння, виробничого вирощування та розпилювального сушіння. Відпрацьоване повітря містить спори від виробника.

Час підготовки насіння в інокуляторі становить 216 годин, а виробничий біосинтез - 240 годин. Аерацію проводять зі швидкістю 18,5 ммоль/год. Для підготовки посівного матеріалу використовуються три інокулятори об'ємом 30, 300 і 3000 літрів, а для виробничого біосинтезу - один ферментатор об'ємом 3000 літрів. Таким чином, приблизні викиди за один цикл ферментації становлять:

$$(30 \cdot 216) + (300 \cdot 216) + (3000 \cdot 216) + (30000 \cdot 240) = 7919280 \text{ л} = 7919,28 \text{ м}^3$$

**Характеристика газоподібних відходів під час виробництва
авермектину**

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (м ³)	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ, аерозоль грибних спор	78,15	IV

8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Анаеробне біологічне очищення стічних вод здійснюється за допомогою обладнання, зображеного на рис. 8.1[3]. Система аеробного біологічного очищення стічних вод, що включає біореактор з системою трубопроводів для розподілу і відведення стічних вод, системою подачі повітря і волокнистими носіями для іммобілізації мікроорганізмів, перфорованими і розташованими над системою подачі повітря. Система розташована в нижній частині біореактора.

Посилення біохімічних процесів в аеробному біореакторі забезпечується тим, що процес очищення стічних вод відбувається по всьому об'єму біореактора, а стічні води рівномірно розподіляються по перфорованих трубопроводах на дні споруди. Таке розташування розподільчих трубопроводів запобігає потраплянню неочищених стічних вод на вихід очищення, яке здійснюється методом постійного струму. Він також забезпечує стабільну роботу аеробного біореактора навіть за наявності токсичних речовин або залпових скидів у стічних водах.

Система аерації, встановлена на дні біореактора, максимально насичує киснем стічні води та мікроорганізми і запобігає осіданню зважених часток на дно. Коли стічні води потрапляють у повітряний потік, вони забезпечують

максимальний висхідний рух, перемішування і контакт з мікроорганізмами, іммобілізованими у волокнистому середовищі. Висхідному руху стоків також сприяє гідростатичний тиск, що створюється подачею стоків.

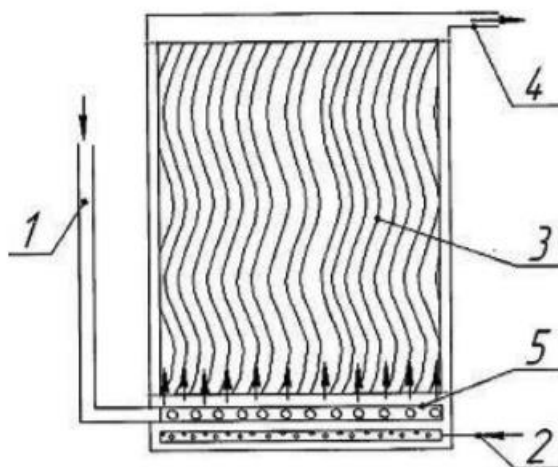


Рис. 8.1 Пристрій для анаеробного біологічного очищення стічних вод

Висхідний рух стоків умовно розділяє біореактор на зони з різним складом стоків, що відображає зміни мікробного біоценозу у вертикальній площині. На рисунку 1 показана принципова схема системи аеробного біологічного очищення стічних вод.

Апарат складається з завантажувача стічних вод 1, подавача повітря 2, волокнистого середовища для іммобілізації мікроорганізмів 3, патрубку для відведення стічних вод 4 і перфорованої труби для розподілу стічних вод 5. Пристрій працює наступним чином. Стічні води через систему подачі 1 надходять в конструкцію гідростатично і рівномірно розподіляються через перфорацію 5 в каналізаційну систему. Стічна вода рухається вгору по конструкції і контактує з мікроорганізмами, іммобілізованими у волокнистому середовищі 3, які очищують стічні води від органічних речовин. Очищена вода відводиться через трубопровід 4.

Система розподільчого трубопроводу стічних вод перфорована і розташована над системою подачі повітря для забезпечення рівномірного розподілу стічних вод в об'ємі біореактора. Це забезпечує стабільну роботу

об'єкта навіть у разі залпових викидів або високих концентрацій забруднюючих речовин, у тому числі небезпечних. Висхідний рух стічних вод у біореакторі максимізує контакт стічних вод і повітря з мікроорганізмами, іммобілізованими на волокнистих носіях, що призводить до покращення окислювальної здатності конструкції. Ефективність біологічного очищення стічних вод становить до 93-97% за органічними речовинами та 97-98% за амонійним азотом[3].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Упаковки для миючих засобів відокремлюються від поліетилену, полівінілхлориду та паперу і відправляються до центрів переробки для повторного використання.

Біомаса, що залишається після фільтрації, містить високий рівень білкових поживних речовин у вигляді клітин-продуцентів і тому пропонується для використання в якості кормової добавки. Рецепт білкових добавок виглядає наступним чином.

- 1) Змішування відфільтрованої біомаси та зернової сировини.
- 2) Екструдувати при температурі 110-130 °С протягом 1-2 хвилин.
- 3) Охолодити до температури приблизно 10 °С.
4. Подрібнити до необхідного розміру згідно з відповідним рецептом корму.[2].

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Для очищення відпрацьованого аераційного повітря на виході з ферментера встановлюється блок очищення повітря[4]. Спосіб передбачає попереднє очищення повітря, що надходить в очисну установку, на фільтрі, який затримує тверді частинки і перевищує температуру навколишнього середовища на $T = 5-30^{\circ}\text{C}$, і пропускання нагрітого повітря через фільтр. Пройшовши послідовно через шари адсорбції та каталізатора, очищене повітря потрапляє на вихід.

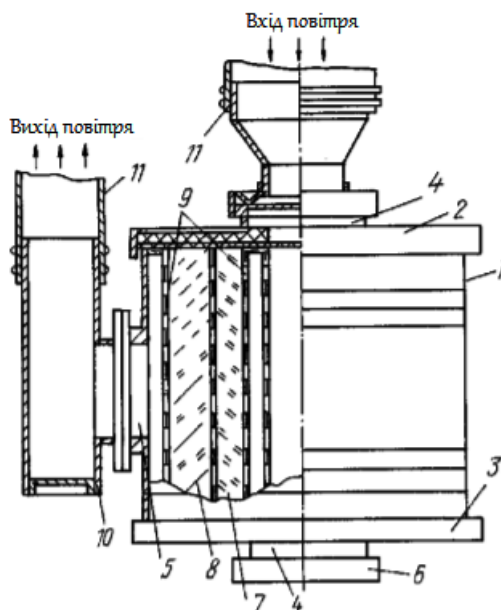


Рис. 8.2 Установка для очищення повітря

Запропонований фільтрувальний модуль (рис. 8.2) складається з циліндричного металевого корпусу (1), кришки (2) та дна (3). Корпус має три отвори (два торцеві отвори для всмоктування (4) і один бічний отвір для витяжки (5)) з номінальним діаметром проходу 150 мм. Один торцевий отвір можна закрити заглушкою (6) або з'єднати з сусіднім модулем, якщо це необхідно. Корпус (1) містить адсорбент (7), каталізатор (8) і пористу перегородку (9), що їх розділяє. Вихідний отвір (5) з'єднаний з трубою для відведення повітря (10). За необхідності кілька модулів з'єднуються між собою еластичними муфтами (11).

Адсорбційний шар (7) і шар каталізатора (8) являють собою порожнисті циліндри, шар адсорбенту розміщений всередині шару каталізатора, і обидва шари встановлені коаксіально з корпусом.

Запропонований модуль фільтрації працює наступним чином. Повітря надходить у порожній простір модуля через вхідний отвір (4), проходить спочатку через шар адсорбенту (7), а потім послідовно через шар каталізатора (8) і виходить через бічний отвір (5). Якщо фільтруючий модуль обладнаний

системою примусового нагріву (не показано), то перед подачею на вхід (4) очищене повітря нагрівається до температури $T = 5-30^{\circ}\text{C}$ вище температури навколишнього середовища.

Запропонований фільтрувальний модуль досягає високої ефективності очищення повітря (10-кратне зниження концентрації газоподібних шкідливих компонентів у відпрацьованих газах вентиляції гаражів) при продуктивності 600 м³/год на модуль.

8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Заходи щодо зменшення кількості стічних вод. Для зменшення об'єму стічних вод для миття використовуються раковини SIR, які зменшують кількість використовуваного миючого засобу і дозволяють повторно використовувати миючий засіб після миття.

Заходи щодо зменшення газоподібних відходів. Відпрацьоване повітря можна фільтрувати і використовувати як теплоносій для розпилювальних сушарок.

Під час біосинтезу авермектину *Streptomyces avermitilis* Biok № 04 утворюється велика кількість відходів, які не становлять загрози для навколишнього середовища. Рідкі відходи - це стічні води, що утворюються на етапі санітарної обробки виробничого процесу. Системи аеробного біологічного очищення стічних вод, що включають систему трубопроводів для розподілу і відведення стічних вод, біореактор з системою подачі повітря і волокнистими носіями для іммобілізації мікроорганізмів, перфорований і розташований над системою подачі повітря. Система розташована під біореактором і цим трубопроводом. Більшість твердих відходів - це біомаса продуцента, яка залишається після фільтрації, і її пропонується використовувати як білкову добавку до корму після попередньої підготовки. Найбільший обсяг становлять газоподібні відходи, відпрацьоване аераційне повітря. Для очищення відпрацьованого аераційного повітря пропонується встановити повітроочисник на виході повітря з ферментера.

Отже, беручи до уваги вищесказане, можна припустити, що виробництво авермектину є екологічно чистим з максимальною утилізацією відходів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Тарасенко А.А. Комбинированная фармакологическая коррекция побочных и токсических эффектов Баймека у животных: Автореф. дисс. на соиск. учен. степ. канд. вет. наук. Омск, 2019. 28 с.
2. Джафаров, М.Х. Получение авермектинов: биотехнологии и органический синтез / М.Х. Джафаров, Ф.И. Василевич, М.Н. Мирзаев // Сельскохозяйственная биология. – 2019. - Т. 54. - №2. - С. 199-215.
3. Авермектины [Электроний ресурс] – Режим доступу: <http://dimetris.com.ua/site/all/avermektini> .
4. Комплекс природних авермектинів [Электроний ресурс] – Режим доступу: <https://superagronom.com/substance/kompleks-prirodnih-avermektiniv-id17943> .
5. Давыдова Е. М. Технология получения авермектинового комплекса, продуцируемого культурой *Streptomyces avermitilis*: Автореф. дисс. на соиск. учен. степ. к.т.н. Спец. 05.18.10.
6. Пат. 015481. Пестицидные композиции/ Вольдум Хенриетте Сие, Педерсен Мортен. Оpubл. 31.08.2011.
7. Джафаров М.Х. Противопаразитарные препараты на основе нового полусинтетического авермектина сумектина и природных авермектинов (получение, фармакотоксикологическая характеристика, производственное испытание): Автореф. дисс. на соиск. учен. степ. док. биол. наук. Москва, 2018.
8. Пат. RU2147320C1. Штамм *Streptomyces avermitilis* НИЦБ 132-продуцент авермектинов/ Даниленко В.Н. Оpubл. 10.04.2000.
9. He F., Liu W., Sun D., Luo S., Chen Z., Wen Y., Li J. Engineering of the TetR family transcriptional regulator SAV151 and its target genes increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 98(1): 399–409. doi:10.1007/s00253-013-5348-1.

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ		
Зм.	Кільк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Гайдамака			Стадія	Аркуш	Аркушів
Перевірів		Красінько				78	
ЛІТЕРАТУРА					Кафедра БТМ		
Затвердив		Стабніков					

10. Liang J.-G., Chu X.-H., Xiong Z.-Q., Chu J., Wang Y.-H., Zhuang Y.-P., Zhang S.-L. Oxygen uptake rate regulation during cell growth phase for improving avermectin B1a batch fermentation on a pilot scale (2 m³). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011, 27(11): 2639–2644. doi:10.1007/s11274-011-0737-z.
11. Meng L., Xiong Z., Chu J., Wang Y. Enhanced production of avermectin by deletion of type III polyketide synthases biosynthetic cluster rpp in *Streptomyces avermitilis*. *Letters in Applied Microbiology*. 2016, 63(5): 384–390. doi:10.1111/lam.12635.
12. Определитель бактерий Берги. – 9-е изд. / Пер. под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2. – 800 с.
13. *Streptomyces avermitilis* MA-4680 is a mesophilic bacterium that builds an aerial mycelium and was isolated from soil [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/16214> .
14. Guo J., Ma R., Su B., Li Y., Zhang J., Fang J. Raising the avermectins production in *Streptomyces avermitilis* by utilizing nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs). *Scientific Reports*. 2016, 6(1). doi:10.1038/srep25949.
15. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: Лабораторний практикум – К.:НУХТ, 2009. – 302с.
16. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.
17. Zhang P., Hai H., Sun D., Yuan W., Liu W., Ding R., Chen C. A high throughput method for total alcohol determination in fermentation broths. *BMC Biotechnology*. 2019, 19(1). doi:10.1186/s12896-019-0525-7.
18. Koistinen J., Sjöblom M., Spilling K. Determining Inorganic and Organic Nitrogen. *Methods in Molecular Biology*. 2018, 1980: 71-80. doi: 10.1007/7651_2019_252.

19. Lin Z., Chen H., Lin J.-M. Peroxide induced ultra-weak chemiluminescence and its application in analytical chemistry. *The Analyst*. 2013, 138(18): 5182. doi:10.1039/c3an00910f.

20. Meseguer-Lloret S., Molins-Legua C., Verdú-Andrés J., Campíns-Falcó P. Chemiluminescent Method for Detection of Eutrophication Sources by Estimation of Organic Amino Nitrogen and Ammonium in Water. *Analytical Chemistry*. 2006, 78(21): 7504–7510. doi:10.1021/ac0604437.

21. Nova-Pak C18 Column, 60Å, 4 μm, 3.9 mm X 150 mm, 1/pk [Електроний ресурс] – Режим доступу: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/wat086344-nova-pak-c18-column-60a-4--m-39-mm-x-150-mm-1-pk.html> .

22. Патент України на винахід № 69639. Штам *Streptomyces avermitilis* – продуцент авермектинів, речовин антипаразитарної дії/ Іутинська Г. О., Муквич М. С., Козирицька В.Є., Петрук Т. В., Валагурова О. В., Білявська Л.О. Опубл. 15.08.2006.

23. Beckman Coulter System Gold HPLC System [Електроний ресурс] – Режим доступу: <https://www.labx.com/item/beckman-coulter-system-gold-hplc-system/LV41636838> .