МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екології
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту(декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК	_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис)	(підпис)
«___» _____ 20__р.	«___» _____ 20__р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

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

на тему: «Біосинтез стрептоміцину *Streptomyces griseus»*

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

Святослав Валерійович ВЛАСКО _____
(підпис)

Керівник: Юрій Миколайович ПЕНЧУК _____
(підпис)

Консультанти_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Юлія ЦЕЙСЛЕР _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 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

_____Власку Святославу Валерійовичу_____
(прізвище, ім’я, по батькові)
1. Тема роботи _____Біосинтез стрептоміцину *Streptomyces griseus*_____
_____
керівник роботи _____Пенчук Юрій Миколайович, к.т.н., доцент._____,
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кс
2. Строк подання здобувачем роботи___03.02.2023_____
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces griseus*, цільовий продукт: стрептоміцин, об’єм ферментера 10 м^3, коефіцієнт заповнення 0,5_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля
5. Перелік графічного матеріалу
_____
_____
_____
_____

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 – 07.11.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	08.11.2022 – 15.11.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.11.2022 – 25.11.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	26.12.2022 – 31.12.2022	
5	Специфікація обладнання	01.01.2023 – 08.01.2023	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу	09.01.2023 – 16.01.2023	
7	Контроль виробництва	17.01.2023 – 21.01.2023	
8	Охорона довкілля	22.01.2023 – 24.01.2023	
9	Оформлення пояснювальної записки	25.01.2023 – 27.01.2023	
10	Виконання графічної частини проекту	28.01.2023 – 31.01.2023	

Здобувач _____ _____Святослав ВЛАСКО_____
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ _____Юрій ПЕНЧУК_____
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена виробництву антибіотика стрептоміцину. Складається зі вступу, восьми розділів та списку використаної літератури з 19 найменувань. Загальний обсяг роботи – 70 сторінок.

У кваліфікаційній роботі наведено характеристика продукту мікробного синтезу, техніко-економічне обґрунтування проекту, обґрунтування основних стадій технологічного процесу, опис технологічного процесу та захист навколишнього середовища. Графічна частина представлена кресленнями формату А1 – технологічна схема та апаратурна схема.

Наведено та обґрунтовано вибір продуценту, який у порівнянні з іншими аналогами дає більший вихід цільового продукту. Обґрунтовано склад поживного середовища для культивування. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему її підготовки та підібрано режими стерилізації його компонентів. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Особливістю процесу культивування є дотримання асептичних умов, інтенсивне аерування та утворення піни.

Ділянки виробництва стрептоміцину включають: блок допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва та персоналу, підготування приміщень до виробничого процесу, приготування аераційного повітря, приготування та стерилізація піногасника, підготування та стерилізація поживних середовищ), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері.

Ключові слова: *стрептоміцин, Streptomyces griseus, поживне середовище, культивування.*

ВСТУП 6
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту 10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента 12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування 12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента 14
2.4. Таксономічний статус біологічного агента 15
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування 16
3.1. Потреба у цільовому продукті 16
3.2. Розрахунок потужності виробництва 19
3.3. Розрахунок об'єму ферментатора та кількості виробничих циклів 20
3.4. Розрахунок кількості стадій приготування посівного матеріалу 20
3.5. Біосинтез цільового продукту 21
3.5. 1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента 22
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт 23
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми 24
4.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментатора 24
4.2. Обґрунтування вибору стадії приготування аераційного повітря 27
4.3. Особливості приготування та стерилізації поживного середовища 29
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання 32
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. 35
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва 55
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу 55
7.2. Мікробіологічний контроль 60
7.3. Показники росту та синтезу цільового продукту 61
7.3.1. Концентрація біомаси 61
7.3.2. Концентрація цільового продукту 61
7.3.3. Концентрація джерела вуглецю та азоту 62
РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля 63
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів 63
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва 63
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів 63
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів 65
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів 66
8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів 66
ЛІТЕРАТУРА 67

ВСТУП

Антибіотики — низькомолекулярні антимікробні речовини, синтезовані мікроорганізмами чи отримані з природних джерел, а також їх синтетичні аналоги чи похідні, що мають здатність пригнічувати в організмі хворого збудників захворювання або затримувати розвиток злоякісних новоутворень.

Антибіотики - специфічні продукти життєдіяльності або їх модифікації., які мають високу фізіологічну активність по відношенню до деяких груп мікроорганізмів (віруси, бактерії, гриби або до злоякісних пухлин).

Термін „антибіотик” запропонований у 1942 р. американським ученим Ваксманом для позначення речовин, що синтезовані мікроорганізмами і мають антимікробну дію (слово антибіотик походить від двох грецьких слів *анти* - проти, *біос* - життя).

У колишньому СРСР початок досліджень по застосуванню антибіотиків, а саме пеніциліну, відноситься до 1942 р. і належить З.В. Єрмольєвій (пеніцилін уперше відкритий у 1928 р. англійським мікробіологом А. Флемінгом).

Зараз виділено і описано понад 3000 антибіотиків, причому для багатьох з них установлена хімічна структура. Практичне застосування знайшли близько 70, а найчастіше зустрічаються в екстемпоральній рецептурі аптек пеніцилін, стрептоміцин, тетрациклін, левоміцетин, гризеофульвін, еритроміцин, канаміцин та ін.

Лікування інфекційних захворювань антибіотиками основане на їх здатності вибірково пригнічувати розмноження патогенних мікроорганізмів, не надаючи токсичної дії на клітини макроорганізмів. Ця властивість антибіотиків допомагає захисним силам організму боротися з хворобою.

Антибіотики, на відміну від інших лікарських речовин, мають особливості у фізикохімічних властивостях: недостатньо високу стабільність при зберіганні; недостатню кислотостійкість (особливо пеніциліни); мають порівняно короткий період напіврозпаду; взаємодіють з багатьма допоміжними речовинами; погано розчиняються у воді (а водні розчини деяких антибіотиків недостатньо стабільні); термолабільні (що цілком виключає їх термічну стерилізацію); здатні виявляти хімічну чи фармакологічну несумісність при поєднанні з іншими лікарськими речовинами.

Зазначені властивості істотно впливають на технологію лікарських форм з антибіо тиками. Тому необхідно знати фізико-хімічні і фармакологічні властивості антибіотиків і умови, за яких воин зберігаіють свою активність.

В XXI ст. один з напрямків біотехнології, а саме фармацевтична промисловість почала крокувати дуже швидко вперед. Сьогодні відомо дуже велика кількість як вітчизняних так та зарубіжних підприємств по виготовленню лікарських препаратів з метою повного лікування, профілактики або часткової підтримки імунітету людини. В останні роки в структурі інфекційних захворювань безперервно зростає частка інфекцій, які викликаються полірезистентними грам "+" мікроорганізмами. Це перш за все відноситься до стафілококів, серед яких виділяють метилрезистентні штами. Вони характеризуються стійкістю до основних груп сучасних антибіотиків [4].

Актуальність обраної теми. В наші часи зростає потреба у ліках, а також перспективах їх виготовлення. Саме антибіотик стрептоміцин на сьогодні стає актуальним при комплексному лікуванню ентерококкових інфекцій, які набули широкого розповсюдження.. Для багатьох ванкоміцинрезистентних штамів ентерококів розроблена схема лікування, яка передбачає сумісне використання стрептоміцину та ампіциліну. Також стрептоміцин є препарат резерву при лікуванні туберкульозу [1].

Всі вітчизняні фармацевтичні підприємства закуповують субстанцію стрептоміцину за кордоном. Розроблення та реалізація ефективної технологій дозволить забезпечити вітчизняних виробників недорогою субстанцією, що, в

свою чергу, призведе до зниження кінцевої вартості готового лікарського препарату.

Новизна роботи. В розробленій роботі пропонується використовувати новий штам продуцента - *Streptomyces griseus* С-5, продуктивність якого на середовищі, яке містить кукурудзяне борошно, кукурудзяний екстракт та глюкозу як джерела вуглецю, становить 28 мг/мл [17], що майже в 3 рази вище, ніж у вже реалізованих технологіях.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

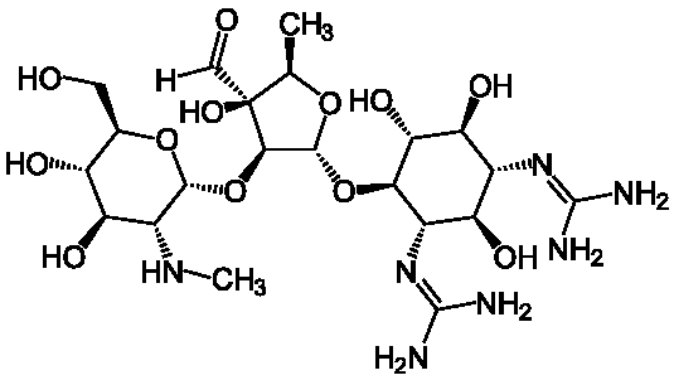


Рис. 1.1. Структурна формула стрептоміцину

Українська назва:

Стрептоміцин

Латинська назва речовини Стрептоміцин:

Streptomycin

Хімічна назва:

5-(2,4-diguanidino-3,5,6-trihydroxy-cyclohexoxy)-4-[4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-methylamino-tetrahydropyran-2-yl]oxy-3-hydroxy-2-methyl-tetrahydrofuran-3-carbaldehyde

Фармакологічна група:

Аміноглікозиди

J01G A01 — антибіотики аміноглікозиди.

Код CAS:

59-01-8

Молекулу стрептоміцину (рис.1.1) можна розглядати як трисахарид, утворений з стрептидину (аміноциклітол), І-стрептози та N-метил-L-глюкозаміну. За хімічною структурою стептоміцин належить до антибіотиків класу аміноглікозиди. А аміноглікозиди належать до аміноциклітолів (циклогексан з гідроксильними та аміно- чи гуанідіно-замісниками) з глікозильними замісниками за однією чи кількома гідроксильними групами. Залежно від природи аміноциклітолу аміноглікозидні антибіотики поділяють на кілька груп. Стрептоміцин належить до основних аміноцикловмісних антибіотиків.

Стрептоміцин має широкий спектр антимікробної (бактерицидної) дії. Він активний відносно *Mycobacterium tuberculosis*, більшості грамнегативних: *Eschericyia coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella* (у тому числі *Klebsiella pneumoniae*), *Hemophilus influenzae, Neisseria gonorroeae, Neisseria meningitidis, Yersinia pestis, Francisella tularensis, Brucella*, та деяких грампозитивних мікроорганізмів: *Staphylococcus, Corinebacterium diphtheriae*. Менш активний відносно *Streptococcus*, (у тому числі *Streptococcus pneumoniae*), *Enterobacter*. Стрептоміцин не активний відносно анаеробних бактерій, *Spirocyaetaceae, Rickettsia, Proteus, Pseudomonas aeroginosa*. Бактерицидну дію виявляє внаслідок зв'язування з 30S-субодиницею бактеріальної рибосоми, що приводить пригнічення синтезу білка.

Стрептоміцин – це речовина природного походження. Порошок або пориста маса білого або майже білого кольору, без запаху, гіркувата на смак. Легко розкладається при нагріванні в розчинах кислот та лугів; легкорозчинний у воді, практично нерозчинний в етиловому та метиловому спиртах, хлороформі та ефірі; гігроскопічний; стійкий у слабокислому середовищі; [α]D –88° (1% водний розчин); pH 28% водного розчину від 4,5 до 7,0. Зберігають у щільно закупореній тарі у сухому, захищеному від світла місці.

Ідентифікують за утворенням фіолетового забарвлення при додаванні до розчину субстанції реактиву Лінга; за утворенням фіолетово-червоного забарвлення при додаванні до розчину субстанції α-нафтолу та натрію

гіпоброміду в лужному середовищі; розчин субстанції дає характерну реакцію на сульфат-іони; при нагріванні препарату з 0,5 М розчином натрію гідроксиду утворюється мальтол (α-метил-β-окси-γ-пірон), який утворює фіолетове забарвлення з розчином ферум (III) хлориду в кислому середовищі (мальтольна проба). Кількісно визначають мікробіологічно; колориметрично за забарвленим продуктом мальтольної проби.

Фармакологічні ефекти. Антибактеріальний (бактерицидний) відносно мікробактерій туберкульозу, більшості грамнегативних та деяких грампозитивних мікроорганізмів.

Застосування. Первинний туберкульоз легенів та інших органів, а також пневмонія, менінгіт, перитоніт, інфекції сечовивідних шляхів, кишкові інфекції, туляремія, чума, бруцельоз, ендокардит.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Таблиця 2.1

Біологічний агент	**Склад поживного середовища:**		**Тривалість культивування, год**	**Концентрація стрептоміцину, г/л**
	компонент	**концентрація, г/л**		
Streptomyces griseus SIPI-11	Соєва олія Соєва макуха NaCl $CaCO_3$	80 30 2 3	144	16
Streptomyces griseus 33-24	Мальтодекстрин Дріжджовий екстракт NaCl $CaCO_3$	150 35 2 3	144	11
Streptomyces griseus C-5	Глюкоза Крохмаль кукурудзяний Кукурудзяний екстракт KH_2PO_4 $(NH_4)_2SO_4$ $CaCO_3$ $MnSO_4$ $MgSO_4$ $CuSO_4$ $FeCl_2$ $ZnSO_4$	4 38 105 11 0,003 3,5 0,017 13,5 0,08 0,16 0,3	84	28

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів стрептоміцину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
S. griseus 33-24	Мальтодекстрин	150	31	4,65	1
	Дріжджовий екстракт	35	1100	38,5	2
	NaCl	2	10	0,02	3
	$CaCO_3$	3	30	0,09	4
	Вартість 1 л середовища – 43,26 грн				
S. griseus SIPI-11	Соєва олія	80	49	3,92	5
	Соєва макуха	30	170	5,1	6
	NaCl	2	30	0,06	3
	$CaCO_3$	3	30	0,09	4
	Вартість 1 л середовища – 9,52 грн				
S. griseus C-5	Глюкоза	4	40	2,4	1
	Крохмаль кукурудзяний	38	80	2,4	2
	Кукурудзяний екстракт	105	30	0,2	3
	KH_2PO_4	11	40	0,002	1
	$(NH_4)_2SO_4$	0,003	70	0,385	2
	$CaCO_3$	3,5	30	0,195	4
	$MnSO_4$	0,017	50	0,002	
	$MgSO_4$	13,5	70	1,02	
	$CuSO_4$	0,08	35	0,03	
	$FeCl_2$	0,16	28	0,01	
	$ZnSO_4$	0,3	54	0,02	
	Вартість 1 л середовища – 5,4 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2022 р.

1. - https://prom.ua/ua/p513471323-maltodekstrin.html;
2 –https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html;
3. - https://produktoff.ua/bakaleya-2/sakhar-sol-soda-29;
4. https://prom.ua/ua/p1304643309-krejda-poroshkova-mel.html?;
5.https://prom.ua/ua/p1389851638-soevoe-maslo.html;
6.https://prom.ua/ua/p788269897-soevyj-zhmyh-shrot.html?&primelead=MC40Mw;
7.https://prom.ua/ua/p1276893456-kaltsij-hloristyj-hlorid.html?&primelead=My41MQ.

Умовна вартість 1 г стрептоміцину, синтезованого на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація стрептоміцину, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного стрептоміцину за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
S. griseus 33-24	11	144	0,764	43,26	0,39
S. griseus SIPI-11	16	144	0,11	4,52	0,28
S. griseus C-5	28	84	0,33	5,4	0,13

Для остаточного вибору більш перспективного біологічного агенту проведемо розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, свідчать, що кількість утвореного стрептоміцину за 1 год є найвищою у *S. griseus* 33-24 (0,764 мг/год), але умовна вартість нижча у *S. griseus* C-5.

Отже, після проведення порівняльної характеристики штамів очевидно, що показники синтезу та тривалості процесу культивування відрізняються в чотирьох продуцентів. Вищий вихід продукту з нижчою тривалістю культивування має штам *S. griseus* C-5.

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

На 2% - процентному глюкозокартопляному агарі на 14-21 день росту при температурі 28°C, pH 6,8-7,2 утворюються колонії діаметром 10 мм. В популяції завжди 5% світло-сірих колоній зі світло-сірим повітряним міцелієм та гемно-каштановою зворотною стороною колонії. Край колоній нерівний з білим краєм. Поверхня колоній складчаста. В центрі колоній знаходиться

підвищення, інколи з кратером. На десятий день росту на поверхні колоній утворюються оксамитові включення.

Максимальне накопичення авермектинів спостерігається на 5-у, 7-у добу при температурі 28°С та швидкості розчинення кисню 1,0-1,3 моль 02 л/хв.

На агаризованих середовищах культура утворює бархатисті колонії від білого до темно-сірого кольору. Колонії радіально складчасті з рівними краями, по центру спостерігається кратер, в середу виділяється розчинний пігмент темно-коричневого кольору. Субстратний міцелій добре прикріплений. Повітряний міцелій спочатку білий, потім сірий, оксамитовий.

Ріст на синтетичних середовищах. На середовищі Чапека з глюкозою або сахарозою утворює дрібні колонії від білого до сірого кольору, поверхня складчаста. Пігмент світло-сірий або світло-коричневі не густий. Крохмально-аміачний агар: колонії дрібні, малоскладчасті, слабопігментовані, білі.

Ріст на органічних середовищах. Картопляний агар: ростуть гуті колонії, міцелій сірий, зворотна сторона агару темно-коричнева або коричнево-фіолетова. Виділяє розчинний пігмент коричневого кольору.

На картопляних скибочках ріст інтенсивний, повітряний міцелій сірий, пігментація сіро-коричневого кольору. На сусло-агарі ріст середній, колонії дрібні, сірі, виділяється пігмент коричневого кольору. Мясопептиднний агар: колонії білі та сіруваті з кільцем, складчасті, слабопігментовані.

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Актиноміцети - це грампозитивні бактерії, які утворюють розгалужені нитки або гіфи у вигляді міцелію. Майже всі аероби.

Стрептоміцети (*Streptomyces*) — рід бактерій типу актинобактерії, грам-позитивних бактерій з високим вмістом гуаніну/цитозину бактерії. Стрептоміцети знаходяться переважно в ґрунті та у залишках рослин, проте на сьогодні їх виділено з усіх екологічних ніш. Більшіть видів формують ендоспори.[8].

Стрептоміцети — одні з найважливіших продуцентів антибіотиків та інших біологічно активних речовин.

Згідно з положенням в другому виданні Керівництва Бергі з систематики бактерій *Streptomyces griseus* належить до:

Відділ: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Підклас: *Actinobacteridae*

Порядок: *Actinomycetales*

Родина: *Streptomycetaceae*

Рід: *Streptomyces*

Вид: *Streptomyces griseus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Виробництво антибіотиків є одним із перспективних напрямів в біотехнологічній промисловості. Їх номенклатура та область застосування з кожним роком зростає. Антибіотики знайшли широке коло використання в різних галузях: сільському господарстві, медицині, фармацевтичній промисловості, харчовій.

На ринку України відсутні антибіотики препарати вітчизняні виробництва, так як на сьогоднішній день не існує жодного діючого підприємства, що випускає антибіотики. У той час, як на світовому ринку обсяги продажу антибіотиків невпинно зростають.

У січні цього року в Міністерстві охорони здоров'я відбулася колегія Державної служби лікарських засобів та виробів медичного призначення. Українські виробники лікарських засобів багато говорили про труднощі в роботі, неуважність до їхніх проблем з боку державних структур, про непрозорі форми реєстрації медичних препаратів та тендерних закупівель. Зазвичай наш виробник чомусь завжди опиняється у невигідній ситуації порівняно із закордонними [4].

3.1. Потреба у цільовому продукті

Сьогодні для понад 500 лікарських засобів, що виробляються в Україні, використовується імпортні субстанції. Вітчизняна фармацевтична промисловість багато в чому стала промисловістю етикеток [8]. Ситуація, яка нині склалась у фармацевтичній промисловості, загрожує безпеці людей. Йдеться та про дедалі більше розповсюдження на нашому ринку та фальсифікатів, та медичних препаратів низької якості, та про стрімке зростання імпорту лікарських засобів, та про факти невиправданих зволікань з реєстрацією вітчизняних ліків [2].

Перелік виробників субстанції стрептоміцину наведені в табл. 3.1:

Таблиця 3.1

Перелік основних виробників субстанції стрептоміцину

№ пп	Назва	Регістраційний номер	Виробник	Країна
1.	Стрептоміцин	П-8-242 N011058	Іпка Лабораториз Лімітед	Індія
2.	Стрептоміцин	П-8-242 N005863	Санавіта Гезундхайтсмітель ГмбХ и Ко.КГ	Германія
3.	Стрептоміцину сульфат	ЛСР-006657/08	Лешан Лонг Марч Мэдисин Індестри Ко.Лтд	Китай
4.	Стрептоміцину сульфат	ЛС-000808	Південно-китайська фармацевтична компанія "Хуашен". Лтд	Китай
5.	Стрептоміцину сульфат	ЛС-002371	Хебей Шеньсюэ Даченг Фармасеутикал Ко.Лтд	Китай
6.	Стрептоміцину сульфат	ЛС-002371	Ченде Миракл Фармасеутикал Ко.Лтд	Китай
7.	Стрептоміцину сульфат стерильный	П-8-242 N006917	Північна Китайська Фармацевтична Корпорація	Китай
8.	Стрептомицина сульфат стерильний	П-8-242 N010783	Лукан Фармацевтическая Компанія	Китай

Ефективність запровадження запропонованої технології у порівнянні з відомими сучасними рішеннями аналогічних виробництв вітчизняної та зарубіжної практики та їх техніко-економічні показники

В розробленому проекті передбачено ряд заходів покладених суттєво підвищити ефективність виробництва стрептоміцину та знизити собівартість кінцевого продукту. Зокрема в представленому проекті запропоновано використовувати новий мутантний штам *Streptomyces griseus* С-5, який здатний синтезувати стрептоміцин в значно вищих кількостях ніж у існуючих аналогів ─ 28 г/л, а також дозволить скоротити тривалість процесу виробничої ферментації.

В представленому проекті, в якості джерела вуглецю запропоновано використовувати соєве борошно та декстрин, що є значно дешевим та ефективнішим субстратом ніж цукор. Як посівний матеріал (для засіву посівного

апарату) запропоновано використовувати культуру вирощену на рідкому поживному середовищі.

Обґрунтування місця будівництва підприємства.

Будівництво цеху по виробництву стрептоміцину, запропоновано будувати в м. Новоград Волинський на території підприємства ВАТ "Новофарм". Перевагами розташування підприємства є наявність вже існуючих забезпечень водопостачання, електропостачання, теплопостачання, а також каналізації, що значно зменшить матеріальні витрати при будівництві цеха. Розташування підприємства біля м. Обухів 40 км від м. Києва, що дозволить забезпечити виробництво професійними спеціалістами (мікробіологи, технологи, механіки, економісти та ін.). Біля зазначеного підприємства проходять розгалужені магістралі автошляхи та гілка залізниці, що дозволить легко налагодити поставки сировини та матеріалів на завод та забезпечити логістику готового продукту до кінцевих споживачів. Однією з основних переваг вибраного місця будівництва є досить низька вартість земельних площ в порівнянні з ціною землі у м. Києві та інших промислових центрах.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

На початку 21 ст. рівень використання стрептоміцину в США на потреби медицини, ветеринарії та сільського господарства становив 11 тон на рік [6].

В Україні на фармацевтичних підприємствах, а саме на ВАТ «Київмедпрепарати», щорічно випускається 10-15 млн. флаконів стрептоміцину, які містять по 1 г препарату, а це 10-15 тон [5].

Отже, приймаємо кількість препарату Стрептоміцину, що забезпечує лікування хворих, становить 10000 кг/р.

Враховуючи, що переважна більшість стрептоміцину (готового) та субстанції імпортується з закордону, то ми плануємо забезпечить 10 % вітчизняного ринку, а це, в свою чергу, буде становити: 10000*0,1=1000 кг. З урахуванням 40 % втрат продукту під час виробництва річна потужність має становити Gp =1000+1000×0,4 = 1400 кг.

Як продуцент використовується *Streptomyces griseus* С-5, продуктивність якого становить 28 мг/мл.

Розрахуємо кількість культуральної рідини, що забезпечить виробництво 1400 кг препарату:

$V_{КР}$ =1400/28= 50 м^3 культуральної рідини.

З урахуванням втрат, які можуть виникнути в процесі виробництва (20 %), річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$V_{КР}^{річ}$ =50+50 × 0,2=60 м^3.

3.3. Розрахунок об'єму ферментатора та кількості виробничих циклів

1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 31.

Ефективний фонд робочого часу $\mathbf{N_{еф} = 31×24 = 754}$ **год.**

Розрахуємо цикл роботи ферментатора:

$\mathbf{T_{цф} = T_{ф}+T_{др} = 48+10 = 58}$ **(год),** де:

Тф – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

Тдр – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (3 год), перевірка на герметичність (1 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

3. Кількість циклів за рік становитиме:

$\mathbf{n_{ц}}$=$N_{ее}/T_{цф}$**=754/58=13 цикли**

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

$\mathbf{V_{КР}^{ц}= V_{КР}^{річ}/ n_{ц}=60/13=4,61}$, а це приблизно **5 м^3.**

Обираємо ферментатор об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення Кз = 0,5. Об'єм культуральної рідини становить Vк.р = 5 м^3, що дорівнює розрахунковому.

3.4. Розрахунок кількості стадій приготування посівного матеріалу

Для вирощування продуценту Стрептоміцину використовують ферментатор загальним об'ємом 10 м^3. Коефіцієнт заповнення $К_{зап.}$ = 0,5. Отже, робочий об'єм ферментатора:

$V_{роб.}$ = $V_{заг.}$ × $К_{зап.}$ = 10 × 0,5 = 5 м^3

Визначаємо кількість стадій приготування посівного матеріалу, для приготування 5 $м^3$ культуральної рідини. Кількість посівного матеріалу становить близько 10 % від загального об'єму поживного середовища.

1) Для приготування 5 $м^3$ культуральної рідини, потрібно: 5 × 0,1 = 0,5 $м^3$ (500 л) посівного матеріалу. Таку кількість посівного матеріалу можна приготувати у ферментаторі об'ємом 1 $м^3$.

2) Щоб приготувати 0,5 $м^3$ культуральної рідини, потрібно: 0,5 × 0,1 = 0,05 $м^3$ (50 л) посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна приготувати у ферментаторі об'ємом 100 л.

3) Щоб приготувати 50 л культуральної рідини, потрібно: 50 × 0,1 = 5 л посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна отримати при культивуванні у колбах на качалках.

Таким чином, процес підготування поживного середовища проходитиме у три етапи, четвертим етапом буде сам процес біосинтезу.

3.5. Біосинтез цільового продукту

3.5. 1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

D-стрептоза утворюється з D-глюкози в результаті рядуїї перетворень. М-метил-Ь-глюкозамін в молекулі стрептоміцину утворюється також з D-глюкози.При застосуванні О-1-14С-глюкози основна частина міченоїглюкози включалася в вуглецевий ланцюг аміносахара по першому углероду. При використанні Про-6-14С-глюкози накопичення мітки спостерігалося в 6-му вуглецевому атомі аміносахара. Таким чином, можна припускати, що можливий механізм перетворюється- перетворення асиметричних вуглеців D-глюкози - один з багаточисленних способів епімерізації. застосування міченого метіоніну А4СН3-Ь-метіонін) показало, що N-метил групи глюкозаміну синтезується з L-метіоніну. Вуглець гуанідинових груп стрептоміцину утворюється з вуглецю СО2. При використанні радіоактивного СО2 було з'ясовано, що майже весь вуглець СО2 включається в гуанідинових бічних ланцюжків:

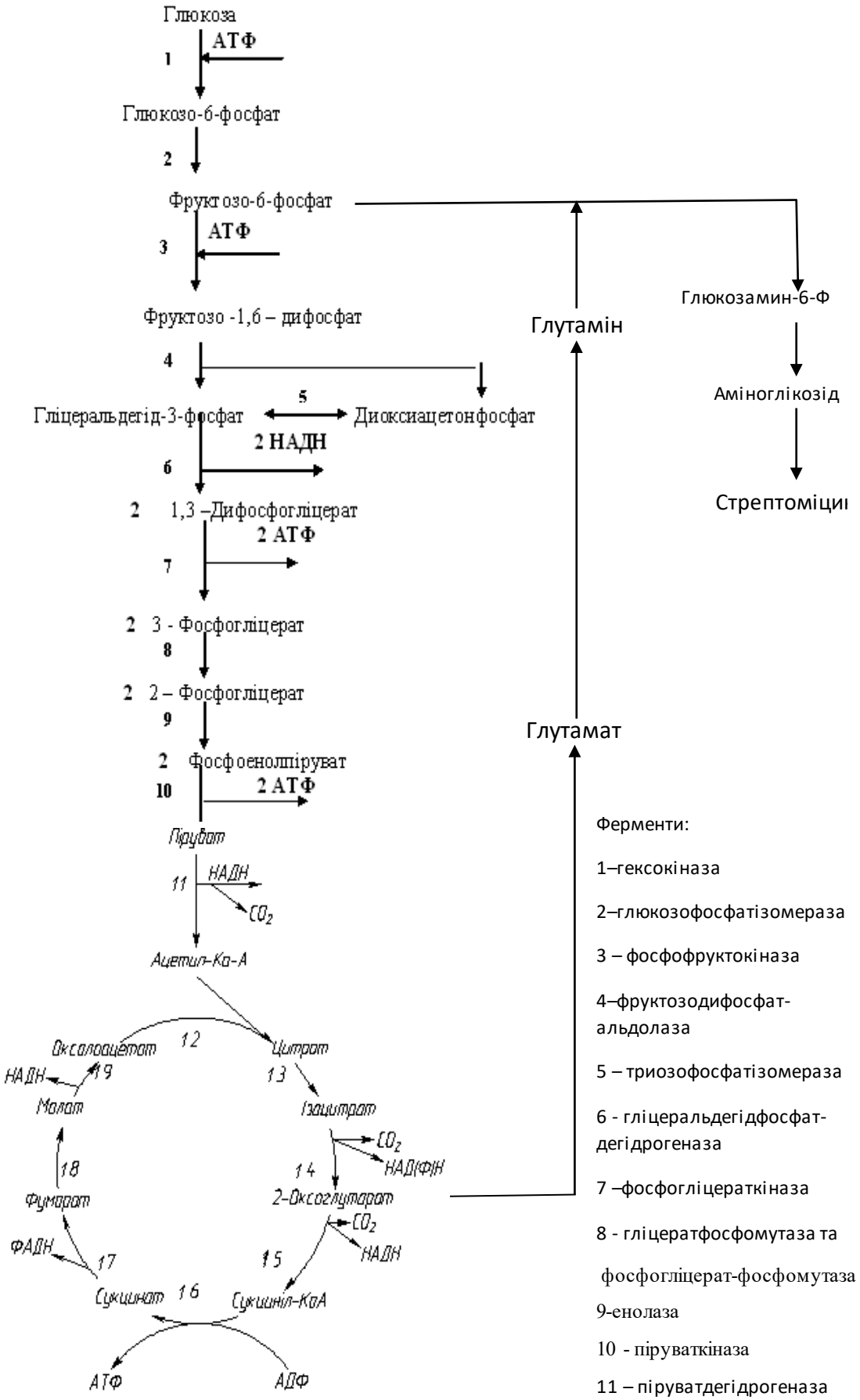
При цьому було встановлено, що більш інтенсивне включення радіоактивного вуглецю СО2 відбувається в тому випадку, якщо СО2 додається

через 2 або 3 доби після посіву стрептоміцетами. При додаванні до середовища хлоргидрата L-аргініну (по 200 мг на колбу) помітно знижується включення 14С в молекулу стрептоміцину, хоча вихід стрептоміцину значно не більшується. Останнє підтверджує наші висновки про те, що присутність аргініну в багатих за складом середовищах може не так помітно стимулювати біосинтез антибіотика.По-видимому, аргінін грає роль донора гуанідинових груп або груп сечовини при біосинтезі стрептоміцину. Можливо,що L-аргінін - проміжне з'єднання при біосинтезі гуанідінової частини молекули стрептоміцину, що цілком узгоджується з нашими уявленнями.У дослідах з відмитим міцелієм стрептоміцетами показано, щоречовини, що містять гуанідинові угруповання (L-аргінін, креатин, креатинін, гуанідин) або легко перетворюються в такі сполуки (цитрулін, орнітин), переводяться клітинамиS.griseus в з'єднання, має принаймні одну гуанідинове угруповання. Це з'єднання потім використовується продуцентом у процесі біосинтезу стрептоміцину.

Гуанідинових групи L-аргініну, мічені по вуглецю,беруть безпосередню участь у біосинтезі молекули стрептоміцину. Вся радіоактивність стрептидіна локалізуєтьсяв гуанідинових угрупованнях.

Мабуть, процес утворення гуанідинових груп стрептоміцину зводиться до того, що під дією ферментів трансамідинова група-C-NH2 переноситься донороmNH L-аргініну на молекулу акцептора.За даними ряду авторів, у продуцента стрептоміцину обна- виявленатрансамідіназна активність, безпосередньо пов'язана з біосинтезом антибіотика. Трансамідиназну активність мають лише ті штами стрептоміцетів, які здатні синтезувати стрептоміцин або гідроксістрептоміцін.

3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт



Ферменти:

1–гексокіназа

2–глюкозофосфатізомераза

3 – фосфофруктокіназа

4–фруктозодифосфат-альдолаза

5 – триозофосфатізомераза

6 - гліцеральдегідфосфат-дегідрогеназа

7 –фосфогліцераткіназа

8 - гліцератфосфомутаза та фосфогліцерат-фосфомутаза

9-енолаза

10 - піруваткіназа

11 – піруватдегідрогеназа

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментатора

Для одержання продуктів життєдіяльності мікроорганізмів використають методи глибинного чи поверхневого культивування.

Глибинний метод культивування продуцентів полягає у культивуванні мікроорганізмів в рідкому поживному середовищі. Він є технічно більш досконалий, ніж поверхневий, так як легко може бути механізований та автоматизований.

Метод глибинного культивування відрізняється від поверхневого тим, що продуцент культивується не на поверхні поживного середовища, а у всьому його об'ємі. Реалізується глибинне культивування в спеціальних апаратах – ферментаторах, забезпечених мішалками та системою подачі стерильного повітря для забезпечення зростання аеробних мікроорганізмів. При періодичному культивуванні весь обсяг поживного середовища засівають посівним матеріалом, який вирощується в оптимальних умовах впродовж певного часу до накопичення потрібної кількості стрептоміцину [9].

Метод глибинного культивування має ряд переваг порівняно з поверхневим. Механічне перемішування та безперервна аерація забезпечують доступ поживних речовин та кисню до всіх клітин продуцента, забезпечуючи сприятливі умови для росту та накопичення продуктів метаболізму. Глибинне культивування вимагає строго певних умов, відповідних фізіологічним потребам, та дотримання стерильності на всіх етапах. Однією з основних умов вдалого вирощування є правильна підготовка посівного матеріалу. Дуже важливим є підтримання pH середовища, так як різка зміна кислотності, свідчать про зміну умов культивування або стану культури в несприятливий бік, можуть призвести до швидкої загибелі культури [9].

Основна вимога до ферментатору – це здатність проводити процес культивування продуцента в асептичних умовах при інтенсивній аерації поживного середовища. У процесі культивування маємо справу зі складною трьох фазною системою рідина – тверде тіло – газ. У такій системі утруднені масообміні процеси, та тому ускладняється апаратурне оформлення всієї стадії вирощування.

По заповненню ферментатору поживним середовищем та перевірки температури, яка не повинна бути вищою за 28°С, у ферментатор із посівного апарата спускають по трубопроводу посівну культуру. Кожні патрубки введення посівної культури в трубопровід та кожний вихід з нього у ферментатор захищені паровими захистами.

Після того, буде внесений посівний матеріал, починається процес вирощування продуценту. Вирощування проводять при постійній аерації. Повітря для аерації через трубопровід поступає на очищення у фільтр та в очищеному вигляді подається в середовище. Необхідна для вирощування температура (27 - 28°С) підтримується подачею води в сорочку чи охолоджуючі труби. Для боротьби з піною, яка утворюється в процесі вирощування додається піногасник із дозатора.

Оскільки продуцент антибіотика належить до числа аерофільних мікроорганізмів, то для їхнього нормального розвитку та функціонування необхідне підведення кисню. При глибинному культивуванні повітря, як правило, вводиться в нижню частину ферментатора за допомогою різноманітних обладнань для рівномірного розподілення його по всьому перерізу ферментатора.

Дихання мікроорганізму відбувається тільки за рахунок кисню, розчиненого в середовищі. Оптимальними є умови для дихання, якщо в середовищі наявна деяка кількість розчиненого вільного кисню. Фактично наявність розчиненого кисню в середовищі визначається відношенням між швидкістю вживання його культурою мікроорганізмів та швидкістю його розчинення в середовищі, яка, звісно, повинна бути більшою. В іншому разі вживання кисню буде визначатися не фізіологічною необхідністю мікроорганізму, а тією кількістю кисню, що встигне розчинитися в умовах аерації, що приведе до кисневої недостатньості, що негативно вплине на розвиток культури: сповільнюються окислювальні процеси. Внаслідок цього культура, що виросла в умовах кисневого голодування,

характеризується низькою інтенсивністю дихання та пониженою здатністю до біосинтезу стрептоміцину.

Отже, основним призначенням барботера в ферментаторі є забезпечення максимального розчинення кисню повітря, щоб в поживному середовищі при культивуванні продуцента знаходився вільний розчинений кисень.

Існує багато способів аерації та перемішування середовища. Для вибору оптимального варіанту проаналізуємо деякі з них.

Самим простим та розповсюдженим способом є подача аераційного повітря в культуральну рідину через барботери. Ступінь подрібнення повітря визначається числом отворів та їх діаметром. При цьому застосовуються барботери різноманітної форми (кільцеві, променеві, та т.д.). Діаметр отворів складає 0,5 – 2мм. Число отворів визначається з розрахунку, щоб їх сумарна площа забезпечувала необхідну швидкість повітря при виході з них. Для одержання максимального ступеня диспергування повітря в деяких випадках допускається швидкість до 100м/с, однак при цьому спостерігається значна втрата напору, тому необхідно підвищити тиск повітря, що подається до 2–2,5 атм. Тому, щоб уникнути значних втрат напору, швидкість повітря повинна бути в межах 5–10 м/с.

Але використання барботерів має суттєві недоліки. Як би дрібно не дрібнилось повітря, при проходженні через рідку фазу окремі маленькі бульбашки спочатку збільшуються, через що величина поверхні контакту фаз зменшується та може зменшуватись насичення. Єдиний спосіб покращення масообміну в цьому випадку – збільшення пропускання повітря через рідину. Тому при аерації за допомогою барботажу завжди необхідна велика витрата повітря.

В процесі росту виробничої культури постійно виникають застійні зони в культуральній рідині поживних речовин та продуктів життєдіяльності, оскільки найближчі до поверхні культури шари середовища збіднюються першими й збагачуються останніми. Тому інтенсивне перемішування при культивуванні продуцента є необхідною умовою нормального розвитку мікроорганізму та максимального накопичення стрептоміцину.

Перемішування середовища за допомогою барботажу є недостатнім, для ферментаторів великого об’ємому (4–5 $м^3$) та вище. Тому аерація та перемішування

середовища лише за допомогою барботеру припустиме лише у випадках, коли вимоги до швидкості вирощуваннння культури не є високими, наприклад в посівних апаратах.

У великих виробничих ферментаторах інтенсифікація перемішування досягається головним чином за допомогою різного роду механічних перемішувачів (лопатеві, пропелерні, турбинні, спеціальні), які не тільки забезпечують максимальний ступінь однорідності поживного середовища, але й добре диспергують повітря. Встановлено, що перемішування за допомогою перемішувачів викликає помітне диспергування повітряної фази, забезпечуючи при одному та тому ж вмісті газової фази в системі значне збільшення поверхні міжфазового контакту та відповідно масообміну між фазами.

Отже, культивування *S. griseus* Реалізується глибинним способом. Продуцент росте на рідкому поживному середовищі та потребує постійної ретельної аерації.

Ферментатори, або біореактори, є ємності, в яких в рідкому поживному середовищі ростуть та розвиваються мікроорганізми. Оскільки саме в них відбувається біосинтез БАР, то їх якість та надійність визначають продуктивність всього технологічного процесу. Тип ферментаторів для кожного біотехнологічного процесу вибирають з врахуванням особливостей продуцента, властивостей поживного середовища та економічних витрат. Тому для культивування *S. griseus* обрано саме глибинний періодичний спосіб культивування у ферментаторі, де забезпечується інтенсивна аерація та перемішування культуральної рідини.

4.2. Обґрунтування вибору стадії приготування аераційного повітря

При культивуванні мікроорганізмів в глибинних умовах потрібна безперервна подача стерильного аераційного повітря в ферментатор, для аерації культуральної рідини. Повітря, що подається в ферментатор, не тільки живить культуру киснем, а також відводить газоподібні продукти обміну разом з фізіологічним теплом, що виділяється мікроорганізмами в процесі росту. Це дозволяє досягнути однорідності мікробної суспензії, збільшує інтенсивність масопередачі та перемішування культуральної рідини.

Очищення аераційного повітря досягається різними способами, які передбачають перш за все позбавлення від мікроорганізмів або їх форм спокою.

Найбільшого розповсюдження дістав метод фільтрації повітря через волокнисті, пористі або полімерні матеріали. Такі матеріали недорогі та мають високу стійкість до стерилізації.

Серед фільтрів попередньої очистки використовують касетні регенеруємі масляні фільтри та касетні фільтри сухого типу. Касетні регенеруємі масляні фільтри працюють з номінальною продуктивністю при запиленості повітря не більше 5 мг/м^3, вловлюють мікроорганізми та частки пилу розміром більше 5 мкм. Такий фільтр затримує на поверхні насадки 92-99% повітряного пилу.

Касетні фільтри сухого типувільні від недоліків масляних фільтрів – запах, втрата масла.

Фільтри грубої очистки. Призначені для вловлювання основної маси грубих домішок, які потрапили в систему після забору атмосферного повітря. Як правило це фільтри великої пилоємкості. Вони називаються фільтрами попереднього очищення. Після цього головний фільтр дублює роботу фільтрів тонкого очищення та підвищує ступінь очистки аераційного повітря.

Фільтри тонкого очищення необхідні для уловлювання найдрібніших контамінантів що пропустили інші фільтри, а також всіх інших можливих часточок, які потрапили в систему випадково. Конструктивно фільтри тонкого очищення дуже схожі на головні фільтри, але вони значно менші за розмірами та в них використовуються більш тонкі фільтруючі елементи.

Контроль ефективності роботи фільтрів, особливо тонкого очищення, контролюється аналізатором очищеного повітря. Для стерилізації фільтрів та повітряних ліній застосовують найчастіше водяну пару. Цей метод створює дуже жорсткі вимоги для вибору фільтруючих елементів, так як через фільтр під тиском пропускається велика кількість водяної пари, з достатньо великим вмістом вологи. Тому більш раціональна двостороння стерилізація фільтруючих елементів водяною парою. Час стерилізації коливається від 30 до 60 хв в залежності від типу фільтру.

4.3. Особливості приготування та стерилізації поживного середовища

Одним з важливих етапів біосинтезу є приготування поживних середовищ. Відділення приготування поживного середовища на сучасному біотехнологічному виробництві - це цех, обладнаний ємностями для зберігання твердих і рідких речовин, засобами їх транспортування і апаратами з пристроями для приготування розчинів, суспензій або емульсій.

Для приготування виробничої поживне середовище попередньо розчиняють цукру і солі, ретельно суспендують такі нерозчинні компоненти, як соєве борошно і крейда. Крохмаловмісну сировину попередньо клейстерізующімся. Для прискорення ці процеси проводять в невеликих апаратах з мішалками (реакторах), а потім розчини змішують у змішувачі-реакторі з плоским дном, забезпеченим барботажное пристроєм для введення пара. Концентрат середовища, що становить близько однієї третини необхідного обєму, для остаточного розчинення і суспендування нагрівають гострим паром до 70-80 ^{0}С. При цій температурі не відбувається розкладання термолабільних компонентів середовища. Приготування більш концентрованих середовищ дає можливість використання змішувачів меншої місткості.

Необхідна умова успішної стерилізації поживного середовища - ретельна гомогенізація її твердих компонентів. При температурі стерилізації великі частки повільно прогріваються, і в них може зберігатися постійна мікрофлора, здатна інфікувати культуральну рідину.

На цьому етапі приготування субстрату необхідно вирішити два завдання: повністю знищити всю контамінантную мікрофлору, яка міститься в необхідному для культивування обсязі рідини, і зберегти біологічну повноцінність поживного середовища.

Існують наступні методи стерилізації обладнання, поживних середовищ і повітря: термічний, хімічний, фільтраційний, радіаційний. Термічний метод найчастіше застосовується для стерилізації обладнання і поживних середовищ і може здійснюватися як нагрівання об'єкта до того, поки не загине вся мікропопуляція.

Рідку поживне середовище після завантаження в ферментер нагрівають до певної температури шляхом подачі пари у внутрішній обсяг ферментера. Цим прийомом досягається стерилізація труб і арматури.

Теплова стерилізація призводить до певних хімічних змін в складі поживного середовища. Деякі з них зводяться до розкладання нестійких до нагрівання сполук, що призводить до втрати необхідних для харчування мікроорганізму речовин. У процесі стерилізації може відбуватися взаємодія різних компонентів середовища і утворення продуктів, що пригнічують ріст мікроорганізмів. більшість змін хімічних інгредієнтів середовища виникає при температурах вище, ніж температура стерилізації.

Отже, ефективна стерилізація в поєднанні з мінімальними змінами середовища може бути досягнута шляхом впливу більш високої температури, а також швидкого нагрівання та охолодження.

Якщо стерилізацію вуглеводів проводити окремо, а потім асептично додавати до іншої заздалегідь простерилізованої поживному середовищі, то можна запобігти реакції між вуглеводами та іншими складовими компонентами середовища. Ті компоненти, які надзвичайно чутливі до дії тепла, також можуть бути простерилізовані окремо. При цьому для стерилізації може застосовуватися іонізуюче опромінення або фільтрація через спеціальні мембранні фільтри.

Для забезпечення контролю стерилізації використовують суперечки тест мікроорганізмів *Bacillus stearothermophilus* штаму 1518. Якщо після проведення стерилізації з ампули з тест-культурою висів дає негативний результат, вважають, що відбулося знищення всіх мікроорганізмів, контаміноване середовище.

Вирішуючи завдання щодо гарантованого стерильності поживного середовища, слід пам'ятати, що режим знезараження не повинен знижувати її біологічну повноцінність. Якщо до складу стерилізується фази входять термолабільні компоненти, то слід прагнути до підвищеної температури (понад 140 ^{0}C), а також до скорочення часу обробки. Лабільність компонентів може бути змінена за рахунок зсуву pH стерилізується середовища. Наприклад, для глюкози оптимальними є pH = 3,0, а для сахарози - pH = 8,0.

Термічний спосіб стерилізації застосовується найбільш часто в мікробіологічної промисловості. Однак для стерилізації твердих поживних середовищ застосовують струми високої частоти. Стерилізація здійснюється впродовж декількох хвилин, при цьому фізико-хімічні властивості компонентів середовища не змінюються.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Апаратурна схема виробництва представлена на одному аркуші креслення.

В таблиці наведена специфікація обладнання.

Позиція	Позначка (марка)	Найменування	Кіль-кість	Маса	Приміт-ка
ПЗ-1	А1і 022.000	Повітрозабірник	1		
Ф-2	ФВГ	Фільтр попередньої очистки	1	Стандартні габарити : від 287х287х 48мм до 750х750х 200 мм, маса від 1,9 до 16 кг	
Н-3	R465	Компресор гвинтовий	1		
Т-4		Конденсатовідводник	1		
Р-5	РВ 270.11	Ресивер об'єм 270 л,	1	95 кг	
Т-6	800тнг-1,6-1,0-м1/20г-4-2-у-і	Теплообмінник	1		
Ф-7		Головний фільтр	1		
Ф-8	ФТО-100	Фільтр тонкої очистки	1		
З-9, З-10, З-11	З-хім-5	Збірник	3		
-	Бестром-1400	Дозатор	22		

З-16, З-18	З-хім-5		3		
Р-17, Р-15, Р-18	Р-КНт-5	Реактор	3		
З-19, З-21	З-хім-5	Збірник	2		
Р-20, Р-22, Р-23	Р-КНт-5	Реактор	3		
З-24, З-25, 3-26	З-хім-5	Збірник	3		
Н-27, Н-29	698243	Насос	2		
Р-28	Р-5-ДпН	Реактор	1		
УБС-25:		УБС-5	1		
	800тнг-1,6-1,0-м1/20г	Теплообмінник-нагрівач	1		
	ПВ-25	Витримувач	1		
	WTT	Теплообмінник ЗАТ «STR»)	1		
Р-33	Р-КНт-5	Реактор	2		
Ін-29	Реак2ВА	Інокулятор (V = 0,06 $м^3$, вертикальний, із сорочкою, барботером, з пропелерною мішалкою (частота обертання-270 об/хв), поверхня теплообміну 6,9 $м^2$, потужність 7 кВт	2		
Па-31	Реак5ВА	Посівний апарат	2		

		(V = 0,63 м^3, вертикальний, із сорочкою, барботером, з пропелерною мішалкою (частота обертання - 270 об/хв)			
Фр-33	Реак50ВА	Ферментатор (вертикальний з сорочкою, з лопатевою мішалкою, обладнаний барботером, оглядовим вікном та люком, V=10 м^3. Робочий тиск 0,1 МПа,	1		

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР1. Санітарна підготовка виробництва

Забезпечує якість виробництва, асептичні умови виробництва.

ДР1.1 Санітарна підготовка персоналу

Персонал одягнений в технологічний одяг. Переміщення і ходіння персоналу обмежене. У виробничих приміщеннях забороняється прийом їжі.

Не рідше 1 разу на квартал персонал проходить технологічний інструктаж за вимогами, які висуваються до нього при роботі на даному виробництві з відповідним записом у журналі.

ДР 1.1.1 Навчання основам санітарії

Не рідше 1 разу на три місяці персонал проходить інструктаж з санітарних основ згідно вимог вимогами, які висуваються до нього при роботі на даному виробництві з відповідним записом у журналі та складає іспит.

ДР 1.1.2 Санітарна обробка рук персоналу

Особливого нагляду потребують руки працівників, їх потрібно завжди тримати в чистоті, мити після кожної відлучення до санвузлів та дезінфікувати спиртом. Нігті на руках повинні бути охайні.

ДР 1.1.3 Перевірка санітарного стану персоналу

Підготовка виробничого персоналу здійснюється відповідно до вимог підприємства.

Особи, що приходять на роботу, піддаються медичному обстеженню. Проводяться інструктажі. Персонал, що працює з отруйними, сильнодіючими речовинами і мікроорганізмами проходить спеціальне навчання. Робітники, які не пройшли навчання не допускають до роботи.

Персонал повинен бути забезпечений спецодягом та засобами індивідуального захисту. Даний етап включає в себе зміну одягу на технологічний та обробку рук дезінфікуючим розчином етанолу.

Під технологічним одягом мають на увазі одяг із безворсової тканини, призначений для захисту матеріалів, напівпродуктів та готового продукту від вторинної контамінації мікроорганізмами та механічними частинками, які виділяє персонал.

Перед проведенням операцій, які стосуються безпосередньо процесу культивування (засів, відбір проб та ін.) персонал повинен мити руки з милом, і знаходитися в чистому одязі

ДР1.2 Підготовка приміщень

Виробничі приміщення повинні мати між собою технологічний зв'язок і розташовуватися за ходом технологічного процесу, не допускаючи перехрещення потоків сировини та готових виробів, чистого та використаного посуду, а також повинні бути створені відповідні умови для дотримання виробничої та особистої гігієни працюючим персоналом.

Для дотримання чистоти у виробничих приміщеннях встановлюють металеві або педальні бачки з кришками, а також корзини із полімерних матеріалів для збору санітарного браку та сміття. Бачки та корзини повинні щоденно очищатися, промиватися та дезінфікуватися дезінфікуючими засобами.

Забороняється зберігати у виробничих приміщеннях миючі, дезінфікуючі засоби, відходи, інвентар, які не мають безпосереднього відношення до виробничого процесу. Зберігання протирального інвентарю, миючих та дезінфікуючих засобів здійснюється в окремих приміщеннях. Інвентар (відра, щітки тощо) повинен бути маркірований і закріплений за виробничими, допоміжними і підсобними цехами.

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень

Щоденне прибирання включає в себе ліквідацію часток пилу та обробка приміщень розчином хлорамін 1% - ої концентрації.

Прибирання підлоги лабораторних приміщень проводять кожної зміни, для знезараження підлоги використовують розчин хлораміну з масовою часткою основної речовини 1%.

Дезінфекція боксу проводиться за допомогою ультрафіолетових ламп.

Прибирання лабораторних приміщень проводять лаборанти.

Щоденне прибирання полягає у проведенні вологого прибирання з використанням приготовлених дезінфікуючих засобів.

При проведенні вологого прибирання використовують для знезараження підлоги розчин хлораміну 1% - ої концентрації . Панелі, стіни, двері у виробничих приміщеннях протирають вологими ганчірками, змоченими розчином "Лотос" з масовою часткою основної речовини 0,5%). Обробку дезковриків біля входу у виробничі приміщення проводять розчином хлораміну 1 % - ої концентрації.

Для обробки столів і інструментів на робочих місцях, де можливі протоки бактеріальних суспензій знаходяться склянки з миючими і дезінфікуючими розчинами. Бавовняною серветкою, змоченою в миючому дезінфікуючому розчині, ретельно протирають робочу поверхню столу, штативи, спиртівку і інші робочі предмети, окрім інструментів і поверхонь, що піддаються корозії, їх обробляють розчином етилового спирту з масовою часткою основної речовини 76%).

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання виробничих приміщень

Генеральне прибирання проводиться 1 раз на тиждень. Воно передбачає не лише миття, але й обробку поверхонь та обладнання дезінфікуючими розчинами з витримкою 30 хв. Після цього залишки дезінфікуючих розчинів змивають.

Відділ контролю якості проводить контроль виробничих приміщень методом змивів 2 рази на тиждень під час виробничого процесу і раз на два тижні безпосередньо, після обробки приміщень.

ДР 1.3 Підготовка обладнання

Особливо ретельно слід мити, чистити та дезінфікувати технологічне обладнання, інвентар.

ДР 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання

Для миття обладнання застосовують миючий засіб – розчин каустичної соди. Каустичну соду використовують у вигляді 5 % розчину підігрітого до температури 60 –70ºС. Цим розчином промивають обладнання впродовж 2 год при

перемішуванні. Відпрацьований розчин йде на стадію знешкодження відходів. По закінченні процесу зливають залишки води з установки.

Ополіскування здійснюють водою водопровідною при Т=30˚С. Далі після зливу вода направляється в збірник нейтралізації.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Технічний огляд обладнання здійснюється візуально по закінченню миття.

ДР 1.3.3 Перевірка на герметичність

Приготування обладнання та комунікацій. Перевірку на герметичність проводять наступним чином: в установку подають мильний розчин під тиском (0,3 мПа), нагрівають. Нещільність в фланцевих з'єднаннях, зварювальних швах знаходяться за допомогою мильної води. Якщо утворюється піна – установка розгерметизована. Знайдені пропуски усувають і проводять повторну перевірку.

ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання

На стерилізацію обладнання надходить пара з тиском 0,2 МПа з температурою (130±2) °С. Пороводять впродовж 40 хвилин. Утворений конденсат утилізують.

ДР 1.4 Підготовка миючих засобів

Також обов’язковим є підготовка миючих та дезінфікуючих засобів, які використовуються для прибирання в приміщеннях, дезінфекції обладнання.

ДР 1.4.1 Приготування 6 % розчину перекису водню

Приготування розчину перекису водню проводять у змішувачі. Препарат використовують для дезінфекції та ополіскування. На 24 л свіжої очищеної води беруть 3 л пероксиду водню (30-35 %) по ГОСТ 177-88Е і ретельно перемішують.

ДР 1.4.2 Приготування розчину Біомою

Для приготування розчину Біомою 10% необхідно 1 кг сухого порошку до якого додають невелику кількість води ретельно перемішують до утворення густої маси. Після чого продовжуючи перемішувати додають воду до 10 л. Процес приготування розчину відбувається у збірнику.

ДР 1.4.3 Приготування 1 % розчину Дезактину

Для приготування розчину беруть 1 $см^3$ 80 %-го концентрату дезактину та доводять об'єм до 1 $дм^3$ питною водою. Процес приготування розчину відбувається у збірнику.

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через забірну шахту на висоті 20- 30 м

ДР 2.2 Очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря проводять через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить через вентилятор до кондиціонеру.

ДР 2.3 Компресування повітря

При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується з 15-25 ºС на вході в повітродувку до 90-100 ºС на виході з неї. Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують.

Після компресора повітря має наступні характеристики: Р= 0,35-0,5 МПа, $t=60^0C$, W=60%.

ДР 2.4 Видалення вологи

Стиснене повітря подається до ресивера. На цій стадій відбувається охолодження повітря до температури 25- 30°С.

ДР 2.5 Головна фільтрація

Попереднє очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється в головному фільтрі. Головний фільтр представляє собою циліндричну ємність з сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщають фільтруючий матеріал. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

Охолоджене повітря, проходячи крізь шар базальтового волокна, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить Е=99,5%.

ДР 2.6 Тонка очистка

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальному фільтрі.

Як фільтруючий матеріал використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Ступінь очищення становить Е=99,99%.

ДР 3. Приготування допоміжних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти

Експериментально було доведено, що для створення pH=5 середовища, яке необхідне, щоб не утворився осад при стерилізації солей додають 6 % розчин HCl, у розрахунку 0,002 л на 1 л середовища. Забезпечення такого pH середовища є обов'язковою операцією технологічного процесу. Врахувавши об'єми інокуляторів (20 л), та ферментерів (320 л), $V_{заг}$ =0.64 л. Необхідний об'єм HCl 320 × 0,002 = 0,64 л. У збірник об'ємом 10 л завантажують 0,12 л 35 % хлорної кислоти заливають 0,52 л води питної і отримують 0,64 л 6 % хлорної кислоти, включають перемішуючий пристрій та підігрівають до температури 40 °С для кращого розчинення подачею пари в рубашку. Вище згаданий розчин хлорної кислоти готується у збірнику і подається у реактори для підтримання pH на рівні 5.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація піногасника

У апарат для стерилізації об'ємом 1000 л вносять рапсову олію (540 л). Вмикають електротен та стерилізують за температури 150 ^{0}С впродовж 1 год. при постійному перемішуванні.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

Для приготування поживного середовища розбиваємо всі компоненти на композиції:

Композиція А: розчини кукурудзяного екстракту, кукурудзяного крохмалю та глюкози.

Композиція Б: карбонат кальцію.

Композиція В: сульфат магнію, сульфат марганцю, сульфат міді, сульфат амонію**,** сульфат феруму (II) та сульфат цинку.

Композиція Г: розчин гідрофосфату калію.

Розрахунок кількості компонентів в поживному середовищі наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Розрахунок кількості компонентів в середовищі

Склад поживного середовище, г/л		Об'єм поживного середовища, л			
		5000 л	500 л	50 л	5 л
		Кількість компонентів в середовищі, г			
KH_2PO_4	4	20000	2000	200	20
$MnSO_4$	0,003	15	1,5	0,15	0,015
$MgSO_4$	3,5	17500	1750	175	17,5
$CuSO_4$	0,017	85	8,5	0,85	0,085
$(NH_4)_2SO_4$	13,5	67500	6750	675	67,5
Fe SO_4	0,08	400	40	4	0,4
$CaCO_3$	11	55000	5500	550	55
$ZnSO_4$	0,16	800	80	8	0,8
Кукурудзяний екстракт	105	525000	52500	5250	525
Глюкоза	4	20000	2000	200	20
Крохмаль кукурудзяний	38	190000	19000	1900	190

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

Для вирощування посівного матеріалу в качалочних колбах 1 потрібно приготувати 5 л культуральної рідини. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища наведено в таблиці.

Розрахунок кількості компонентів для 5 л поживного середовища

Склад поживного середовища, г/л		Компо-зиція	Вміст компонента на 5 л середовища, г/л	Загальна кількість компонентів, г/л	Кількість води, л
Кукуруд-зяний екстракт	105	А	433,65	27,66	2
Глюкоза	4		16,52		
Крохмаль кукурудз-зяний	38		156,94		
$CaCO_3$	11	Б	45,43	45,98	0,5
$MnSO_4$	0,003	В	14,5	3,26	1,5
$MgSO_4$	3,5		0,01		
$CuSO_4$	0,017		0,07		
$(NH_4)_2SO_4$	13,5		55,8		
$FeCl_2$	0,08		0,33		
$ZnSO_4$	0,16		0,66		
KH_2PO_4	0,3	Г	16,52	0,72	0,32

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування розчинів кукурудзяного екстракту, глюкози та крохмалю на технічних терезах у хімічному стаканчику об'ємом 200 мл зважують 433,65 г кукурудзяного екстракту, 16,52 г глюкози, 156,94 крохмалю та додають питну воду (температура 50 ^{0}С) об'ємом 2 л. Розчин перемішують та переносять в стерильні колбу об'ємом 1000 мл. Колби закривають ватно-марлевою пробкою та автоклавуютьпри температурі 112^{0}С впродовж 30 хв.

ДР 4.1. 2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на технічних терезах 45,43 г карбонату кальцію, наважку переносять в металевий стаканчик об'ємом 100 мл та подрібнюють до утворення дрібнодисперсної маси. Подрібнений матеріал переносять в стерильну колбу об'ємом 1000 мл та додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 500 мл та ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та автоклавуютьпри температурі 131^{0}С впродовж 1 години.

ДР 4.1. 3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину солей зважують на електронних терезах сульфат магнію 14,5 г, сульфат марганцю 0,01 г, сульфат міді 0,07 г, сульфат амонію 55,8 г, сульфат феруму (II) 0,33 г та сульфат цинку 0,66 г. Переносять наважки солей у стерильну термостійку колбу, об'ємом 3000 мл та додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 1500 мл. Розчин перемішують. Колбу закривають ватною-марлевою пробкою та автоклавуютьпри температурі 131^{0}С впродовж 1 години.

ДР 4.1. 4. Приготування та стерилізація композиції Г

Для приготування розчину фосфорнокислої солі зважують на електронних терезах 16,52 г гідрофосфату калію та. Переносять наважку у стерильну термостійку колбу, об'ємом 500 мл. В колбу додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 320 мл та 0,1 мл 6 % соляної кислоти. Розчин перемішують. Колбу закривають ватною-марлевою пробкою та автоклавують при температурі 130^{0}С впродовж 1 години.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в **інокуляторі 1 5 л поживного середовища**

Склад поживного середовища, г/л		Компо-зиція	Вміст компонента на 50 л середовища, г/л	Загальна кількість компо-нентів, г/л	Кількість води, л
Кукуруд-зяний екстракт	105	А	45,3	65,3	1
Глюкоза	4		1,7		
Крохмаль кукурудз-зяний	38		16,4		
$CaCO_3$	11	Б	42,7	42,3	0,2
$MnSO_4$	0,003	В	0,012	6,71	2
$MgSO_4$	3,5		13,6		
$CuSO_4$	0,017		0,066		
$(NH_4)_2SO_4$	13,5		52,5		
$FeCl_2$	0,08		0,31		
$ZnSO_4$	0,16		0,62		
KH_2PO_4	0,3	Г	15,56	1,5	1

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композицій А

Для приготування розчину крохмалю на технічних терезах у відкритій металевій ємності об’ємом 2 л зважують 45,36 г кукурудзяного крохмалю та додають питну воду (температура 50 ^{0}C) об’ємом 0,783 л. Розчин ретельно перемішують за допомогою металевого шпателя та кип‘ятять впродовж 5 хв. По закінченню кип‘ятіння в ємність вносять наважки попередньо зважених на технічних терезах глюкози та кукурудзяного екстракту у кількостях 1,7 г та 16,4 г відповідно. Отриману суміш перемішують металевим шпателем та переносять в

колби. Стерилізація відбувається в автоклаві. Надлишковий тиск в апарат 0,05 МПа, температура 112^{0}С. Тривалість стерилізації становить 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на технічних терезах 42,7 г карбонату кальцію, наважку переносять в металевий стаканчик об'ємом 100 мл та подрібнюють до утворення однорідної маси.

Подрібнений матеріал переносять у апарат для стерилізації об'ємом 5 л, додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 1,8 л та ретельно перемішують за допомогою мішалки. Отриману суспензію автоклавують при 0,15 МПа та температурі 131^{0}С впродовж 1 години.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину солей зважують на технічних терезах сульфат магнію 13,6 г, сульфат марганцю 0,012 г, сульфат міді 0,066 г, сульфат амонію 52,5 г, сульфат феруму (II) 0,31 г та сульфат цинку 0,66 г. Переносять наважки солей колби, додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 0,9 л та ретельно перемішують. Отриманий розчин автоклавують при 0,15 МПа та температурі 131^{0}С впродовж 1 години. Об'єм конденсату становить 0,1 л.

ДР 4.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г

Для приготування розчину фосфорнокислої солі зважують на електронних терезах 15,56 г гідрофосфату калію та переносять наважку у стерильну термостійку колбу, об'ємом 2 л. В колбу додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 500 мл та 5 мл 6 % соляної кислоти. Розчин перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та автоклавують при температурі 130^{0}С впродовж 1 години.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в **інокуляторі 2 50 л поживного середовища**

Склад поживного середовища, г/л		Компо-зиція	Вміст компонента на 50 л середовища, г/л	Загальна кількість компо-нентів, г/л	Кількість води, л
Кукуруд-зяний екстракт	105	А	453,6	653	10
Глюкоза	4		17,28		
Крохмаль кукурудз-зяний	38		164,16		
$CaCO_3$	11	Б	427,9	423,9	2
$MnSO_4$	0,003	В	0,12	671,38	20
$MgSO_4$	3,5		136,15		
$CuSO_4$	0,017		0,66		
$(NH_4)_2SO_4$	13,5		525,15		
$FeCl_2$	0,08		3,1		
$ZnSO_4$	0,16		6,2		
KH_2PO_4	0,3	Г	155,6	155,6	1

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композицій А

Для приготування розчину крохмалю на технічних терезах у відкритій металевій ємності об'ємом 20 л зважують 453,6 г кукурудзяного крохмалю та додають питну воду (температура 50 ^{0}C) об'ємом 7,83 л. Розчин ретельно перемішують за допомогою металевого шпателя та кип'ятять впродовж 5 хв. По закінченню кип'ятіння в ємність вносять наважки попередньо зважених на технічних терезах глюкози та кукурудзяного екстракту у кількостях 17,28 г та 164,16 г відповідно. Отриману суміш перемішують металевим шпателем та переносять в апарат для стерилізації ємкісного типу об'ємом 20 л. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Надлишковий тиск в апараті 0,05 МПа,

температура 112^{0}С. Тривалість стерилізації становить 30 хв. Об'єм конденсату становить 0,78 л.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на технічних терезах 427,9 г карбонату кальцію, наважку переносять в металевий стаканчик об'ємом 1000 мл та подрібнюють до утворення однорідної маси.

Подрібнений матеріал переносять у апарат для стерилізації об'ємом 5 л, додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 1,8 л та ретельно перемішують за допомогою мішалки. Отриману суспензію стерилізують подачею пари в апарат при 0,15 МПа та температурі 131^{0}С впродовж 1 години. Об'єм конденсату становить 0,2 л.

ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину солей зважують на технічних терезах сульфат магнію 136,15 г, сульфат марганцю 0,12 г, сульфат міді 0,66 г, сульфат амонію 525,15 г, сульфат феруму (II) 3,1 г та сульфат цинку 6,2 г. Переносять наважки солей у апарат для стерилізації об'ємом 20 л, додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 9 л та ретельно перемішують за допомогою мішалки. Отриманий розчин стерилізують подачею пари в апарат при 0,15 МПа та температурі 131^{0}С впродовж 1 години. Об'єм конденсату становить 0,1 л.

ДР 4.3.4. Приготування та стерилізація композиції Г

Для приготування розчину фосфорнокислої солі зважують на електронних терезах 155,6 г гідрофосфату калію та переносять наважку у стерильну термостійку колбу, об'ємом 2 л. В колбу додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 500 мл та 5 мл 6 % соляної кислоти. Розчин перемішують. Колбу закривають ватною-марлевою пробкою та автоклавуютьпри температурі 130^{0}С впродовж 1 години.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті

Розрахунок кількості компонентів для 500 л поживного середовища

Склад поживного середовища, г/л		Компо-зиція	Вміст компонента на 500 л середовища, г/л	Загальна кіль-кість компо-нентів, г/л	Кількість води, л
Кукуруд-зяний екстракт	105	А	36750	51450	100
Глюкоза	4		1400		
Крохмаль кукурудз-зяний	38		13300		
$CaCO_3$	11	Б	3850	3850	30
$MnSO_4$	0,003	В	1,05	6041	10-
$MgSO_4$	3,5		1225		
$CuSO_4$	0,017		5,95		
$(NH_4)_2SO_4$	13,5		4725		
$FeCl_2$	0,08		28		
$ZnSO_4$	0,16		56		
KH_2PO_4	0,3	Г	1400	1400	57

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування розчину крохмалю за допомогою від'ємно-доливного дозатора у відкриту металеву ємність об'ємом 200 л 36,75 кг кукурудзяного крохмалю та додають питну воду (температура 50 ^{0}C) об'ємом 100 л. Розчин ретельно перемішують за допомогою мішалки та кип'ятять впродовж 5 хв. По закінченню кип'ятіння в ємність вносять наважки попередньо відміряних від'ємно-ваговим дозатором глюкози та кукурудзяного екстракту у кількостях 1,4 кг та 13,3 кг відповідно. Отриману суміш перемішують за допомогою мішалки за допомогою

мішалки та переносять в апарат для стерилізації ємкісного типу об'ємом 500 л. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Надлишковий тиск в апараті 0,05 МПа, температура 112^0С. Тривалість стерилізації становить 0,5 години. Об'єм конденсату становить 50 л.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на технічних терезах 3,85 кг карбонату кальцію, наважку поміщають в молоткову дробарку продуктивністю 10 кг/год та подрібнюють крейду при кількості обертів w=1800 об/хв до утворення однорідної маси, розмір частинок після подрібнення становить 10^{-4} мм. Подрібнений матеріал переносять у апарат для стерилізації об'ємом 50 л, додають питну воду (температура 50^0С) об'ємом 30 л та ретельно перемішують за допомогою мішалки. Отриману суспензію стерилізують подачею пари в апарат при 0,15 МПа та температурі 131^0С впродовж 1 години. Об'єм конденсату становить 0,3 л.

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину солей зважують на технічних терезах сульфат магнію 1,225 кг, сульфат марганцю 1,05 г, сульфат міді 5,95 г, сульфат амонію 4,725 кг, сульфат феруму (II) 28 г та сульфат цинку 56 г. Переносять наважки солей у апарат для стерилізації об'ємом 20 л, додають питну воду (температура 50^0С) об'ємом 0,9 л та ретельно перемішують за допомогою мішалки. Отриманий розчин стерилізують подачею пари в апарат при 0,15 МПа та температурі 131^0С впродовж 1 години. Об'єм конденсату становить 0,1 л.

ДР 4.4.4. Приготування та стерилізація композиції Г

Для приготування розчину фосфорнокислої солі зважують на технічних терезах 1,4 кг гідрофосфату кальцію. Переносять наважку солі у апарат для стерилізації об'ємом 100 л, додають питну воду (температура 50^0С) об'ємом 57 л, 500 мл 6 % соляної кислоти та ретельно перемішують за допомогою мішалки. Отриманий розчин стерилізують подачею пари в апарат при 0,15 МПа та температурі 131^0С впродовж 1 години. Об'єм конденсату становить 5 л.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментатору

Розрахунок кількості компонентів для 5 м^3 поживного середовища

Склад поживного середовища, г/л		Компо-зиція	Вміст компонента на 5 м^3 середовища, кг/м^3	Загальна кількість компо-нентів, кг/м^3	Кількість води, м^3
Кукуруд-зяний екстракт	105	А	331	463,3	900
Глюкоза	4		12,6		
Крохмаль кукурудз-зяний	38		119,7		
$CaCO_3$	11	Б	34,7	34,7	100
$MnSO_4$	0,003	В	0,01	54,31	900
$MgSO_4$	3,5		11,0		
$CuSO_4$	0,017		0,05		
$(NH_4)_2SO_4$	13,5		42,5		
$Fe\ SO_4$	0,08		0,25		
$ZnSO_4$	0,16		0,5		
KH_2PO_4	0,3	Г	12,6	12,6	75

ДР 4.5.1. Приготування композиції А

Для приготування розчину крохмалю за допомогою від'ємно-доливного дозатора у відкриту металеву ємність об'ємом 2 м^3 331 кг кукурудзяного крохмалю та додають питну воду (температура 50 ^{0}С) об'ємом 0,5 м^3. Розчин ретельно перемішують за допомогою мішалки та кип'ятять впродовж 5 хв. По закінченню кип'ятіння в ємність вносять наважки попередньо відміряних від'ємно-ваговим

дозатором глюкози та кукурудзяного екстракту у кількостях 12,6 кг та 119,7 кг відповідно. Отриману суміш перемішують за допомогою мішалки за допомогою мішалки та передають на стерилізацію в УБС-5.

ДР 4.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на технічних терезах 34,7 кг карбонату кальцію, наважку поміщають в молоткову дробарку продуктивністю 100 кг/год та подрібнюють крейду при кількості обертів w=1800 об/хв до утворення однорідної маси, розмір частинок після подрібнення становить 10^{-4} мм. Подрібнений матеріал переносять у збірник-апарат для стерилізації об'ємом 0,2 м^3, додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 0,18 м^3 та ретельно перемішують за допомогою мішалки. Отриману суспензію стерилізують подачею пари в апарат при 0,15 МПа та температурі 131^{0}С впродовж 1 години. Об'єм конденсату становить 20 л.

ДР 4.5.3. Приготування композиції В

Для приготування розчину солей за допомогою від'ємно-доливного дозатора сульфат магнію 11 кг, сульфат марганцю 0,01 кг, сульфат міді 0,05 кг, сульфат амонію 42,5 кг, сульфат феруму (II) 0,25 кг та сульфат цинку 0,5 кг. Переносять наважки солей у збірник об'ємом 5 м^3, додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 3,15 м^3. Розчин ретельно перемішують за допомогою мішалки та передають на стерилізацію в УБС-5.

ДР 4.5.4. Приготування композиції Г

Для приготування розчину фосфорнокислої солі зважують на технічних терезах 12,6 кг гідрофосфату кальцію. Переносять наважку солі у збірник об'ємом 0,1 м^3, додають питну воду (температура 50^{0}С) об'ємом 0,065 м^3. Розчин ретельно перемішують за допомогою мішалки та передають на стерилізацію в УБС-5.

ДР 4.5.5. Передача композицій в збірник та їх стерилізація в УБС-5

Композиції А, Г та Д (загальним об'ємом: 11,43 $м^3$) передають у збірник об'ємом 2,32 $м^3$, додають 30 л соляної кислоти та стерилізують в УБС-5 при температурі 131^0С впродовж 50 хвилин. Нестерильне поживне середовище зі збірника передається на колонку швидкісного нагріву. Потім поживне середовище надходить у теплообмінник-витримувач.. Для охолодження поживне середовище надходить у теплообмінник, де охолоджується до температури культивування 25^0С, після цього стерильне та охолоджене середовище за допомогою насоса подається у простерилізований ферментатор. Об'єм конденсату становить 0,23 $м^3$.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

Посівний матеріал готують глибинним способом.

ТП 5.1. Вирощування посівного матеріалу для засіву колб Вирощування посівного матеріалу для засіву колб попередньо Реалізується в лабораторії.

ТП 5.2. Приготування посівного матеріалу в колбах на качалках 1

Для вирощування рідкого посівного матеріалу першої генерації у колбах використовують підготовку і стерилізацію поживного середовища. У пробірку з робочою культурою вносять фізіологічний розчин, змивають культуру і вносять у колбу з рідким поживним середовищем. Значення pH доводять до 7,0-7,1 конц. NaOH.

Посівний матеріал вирощують 48 год за температури 28°С на качалці, в якій встановлюють 230-240 об/хв. У готовому посівному міцелії визначають кількість біомаси методом центрифугування при 3000 об/хв 15 хв. Біомаса складає 28-30 об. %.

ТП 5.3. Приготування посівного матеріалу в інокуляторі

Для вирощування рідкого посівного матеріалу другої генерації у посівний апарат стерильно вносять підготовлене і простерилізоване поживне середовище.

Посівний матеріал, вирощений у качалочних колбах, в стерильних умовах зливають у посівну колбу і переносять в апарат. Кількість посівного матеріалу, вирощеного у колбах на качалці, становить 10 % від об'єму що засівається. Під час посіву перекривають подачу повітря в апарат і знижують тиск до 0. Після чого

вносять посівний матеріал з посівної колби та створюють в апараті надлишковий тиск (0,015-0,02 МПа). Контроль тиску в апараті здійснюється манометром.

Після засіву інокулятора вмикають мішалку (230-240 об/хв) та спостерігають за показниками датчика pO_2. При зниженні показника на 20 % встановлюють мінімальні витрати повітря. Регулювання швидкості перемішування і витрат повітря здійснюють за показником pO_2, яке повинно становити 30-40 %. Концентрацію розчиненого кисню підтримують на заданому рівні при одночасному збільшенні як витрат повітря, так і швидкості перемішування. Процес культивування відбувається за температури 28 ºС упродовж 48 год.

Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність контамінуючої мікрофлори (мікроскопіювання) та визначають рівень біомаси.

ТП 5.4. Приготування посівного матеріалу в посівному апараті

Для вирощування рідкого посівного матеріалу другої генерації у посівний апарат стерильно вносять підготовлене і простерилізоване поживне середовище.

Посівний матеріал, вирощений у качалочних колбах, в стерильних умовах зливають у посівну колбу і переносять в апарат. Кількість посівного матеріалу, вирощеного у колбах на качалці, становить 10 % від об’єму що засівається. Під час посіву перекривають подачу повітря в апарат і знижують тиск до 0. Після чого вносять посівний матеріал з посівної колби та створюють в апараті надлишковий тиск (0,015-0,02 МПа). Контроль тиску в апараті здійснюється манометром.

Після засіву інокулятора вмикають мішалку (230-240 об/хв) та спостерігають за показниками датчика pO_2. При зниженні показника на 20 % встановлюють мінімальні витрати повітря. Регулювання швидкості перемішування і витрат повітря здійснюють за показником pO_2, яке повинно становити 30-40 %. Концентрацію розчиненого кисню підтримують на заданому рівні при одночасному збільшенні як витрат повітря, так і швидкості перемішування. Процес культивування відбувається за температури 28 ºС упродовж 48 год.

Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність контамінуючої мікрофлори (мікроскопіювання) та визначають рівень біомаси.

ТП 6. Біосинтез

ТП.6.1. Виробниче культивування

Засів посівним матеріалом ферментера здійснюється в кількості 10 % від робочого об’єму. Далі включають перемішуючий пристрій (150-210 об/хв) і слідкують за показниками датчика pO_2. Концентрацію кисню розчиненого підтримують на заданому рівні при одночасному збільшенні як витрат повітря, так і швидкості перемішування. Якщо показник знижується до 20 % встановлюють мінімальні витрати повітря і мінімальні оберти мішалки. Процес буде відбуватися за показниками датчика pO_2, (30-40 % від насичення повітрям).

Співвідношення масових часток органічного азоту і полісахаридів складає 1,0:0,6. Процес культивування ведуть при наступних параметрах: температура 28 ºС від початку культивування до 30 год, тобто до моменту набору об'ємної частки вологої біомаси 15%, а далі до кінця процесу 23 ºС.

Аерацію і перемішування здійснюють так, щоб парціальний тиск розчиненого кисню було не нижче 30% від насичення. Далі до кінця процесу підтримують значення pH в межах 5,7÷ 0,2 допомогою дозування аміачної води і соєвої олії, а також розчинів їдкого натру і сірчанокислого амонію. Дозування здійснюють так, щоб масова частка амонійного азоту знаходилася в межах 0,04-0,1%, а шар масла на поверхні при визначенні об'ємної частки вологої біомаси методом центрифугування при 3000 об / хв протягом 15 хв не перевищував 1 мм. Через 150 год культивування активність культуральної рідини становить 20000 од. / мл.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
К1.2.1 Технологічний контроль приготування розчину Біомою	Концентрація розчину	Фізичні методи визначення концентрації	Після приготування розчинів	С = 3 % τ = 4 хв
К1.2.2 Технологічний контроль приготування розчину Дезактину	Концентрація розчину	Фізичні методи визначення концентрації.	Після приготування розчинів.	С = 0,3 %
К1.2.3 Технологічний контроль приготування розчину перекису водню	Концентрація розчину	Фізичні методи визначення концентрації.	Після приготування розчинів.	С = 2 % t = 26 ^{0C} τ = 5 хв
К1.3.2 Технологічний контроль щоденного прибирання	Концентрація мікроорганізмів	Мікробіологічний метод, висіви на чашки Петрі	Після щоденного прибирання	КУО < 400

К1.3.2 Технологічний контроль генерального прибирання	Концентрація мікроорганіз-мів	Мікробіологічний метод, висіви на чашки Петрі	Після генерального прибирання	КУО < 200
К1.4.1 Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій	Температура та час	Термометр технічний, годинник	Під час проведення миття	t= 70 °С τ = 15 хв
К1.4.2 Технологічний контроль ополіскування обладнань та комунікацій	Температура	Термометр технічний,	Під час проведення ополіскування	t = 20 °С
К1.4.3 Технологічний контроль герметичності обладнання	Тиск	Датчик	Після миття та ополіс-кувавння обладнання	Р = 0,5 МПа τ = 30 хв
К1.4.4 Технологічний контроль стерилізації обладнання та комунікацій	Режим стерилізації вузлів обладнання. Тиск. Температура.	Манометр технічний Термометр	Температура та тиск визначаються безперервноп ід час виробничого процесу.	Р = 0,2 МПа τ = 20 хв t = 140 °С
К2.1. Технологічний контроль очищення повітря від пилу та механічних часток	Ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Пезперервно при подачі повітря	Е = 80 %
К2.3. Технологічний контроль стиснення повітря	Тиск, температура	Часточки бруду; манометр	Пезперервно при подачі повітря	Р = 0,35 МПа t = 120 °С

К2.4.Технологічний контроль при стабілізації термодинамічних показників повітря	Температура, тиск, вологість	Термометр, барометр, вологомір	Безпосередньо під час нагрівання	t = 60 ˚С, Р = 0,35 МПа W = 60 %.
К2.5. Технологічний та мікробіологічний контроль стерильності повітря в головному фільтрі	Повітря, вміст мікроорганізмів та часток	Мікробна контрміна-ція (проба повітря КУО/м^3) Седиментаційний (седи-ментація на пластинку КУО/м^3)	Під час кожної зміни, під час виробничого біосинтезу	Не повинно бути життєздатних мікроорганізмів, та макси-мально допустиме число часток в 1м^3 повітря 200. Е = 95%
К2.6. Технологічний та мікробіологічний контроль повітря після очищення в індивідуальному фільтрі	Ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Пезперервно при подачі повітря	Е = 99,999 % КУО < 1
К3.1. Технологічний контроль стерилізації піногасника	Концентрація компонентів Температура Час	Термометр технічний Годинник	Безперервно під час вирощування посівного матеріалу в ферментаторі	τ = 30 хв t= 131 °С КУО < 1

К4.1. Технологічний контроль при приготуванні соляної кислоти	Концентрація соляної кислоти	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	С = 6 %
К4.2. Технологічний контроль приготування розчину гідроксиду натрію	Концентрація гідроксиду натрію	Фізико-хімічний метод	Після приготування емульсії	С = 10 %
К5.1.1.; К5.2.1. К5.3.1.; К5.4.1. К5.5.1.; К5.6.1. Мікробіологічний та технологічний контроль приготування та стерилізації композиції А	Режим стерилізації розчину Температура Час Мікробна контамінація	Технічний термометр годинник чашки Петрі	Температура визначається безперервно під час стерилізації. Автоматичний регулятор температури Мікробіологічний метод, розведення та висів на МПА	t = 112˚С τ = 30 хв КУО < 1
К5.1.2.; К5.2.2. К5.3.2.; К5.4.2. К5.5.2.; К5.6.2. Мікробіологічний та технологічний контроль приготування та стерилізації композиції Б	Режим стерилізації розчину солей Температура Час Мікробна контамінація	Технічний термометр годинник чашки Петрі	Температура визначається безперервно під час стерилізації. Автоматичний регулятор температури Мікробіологічний метод, розведення та висів на МПА	t = 131˚С τ = 40 хв КУО < 1
К6.1. Технологічний та мікробіоло-	Температура Час pH	Термометр технічний pH-метр	Під час вирощування посівного	t = 30 °С pH = 7,2 τ = 24 год

гічний контроль вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Кількість обертів	Годинник	матеріалу в колбах	w = 280 об/хв. X = 4,5 г/л КУО $_{ст. м.}$ < 1
К6.2. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в та інокуляторі.	Температура Час pH Концентрація біомаси	pH-метр, Термометр Годинник	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	pH =7,2, τ = 24 год, t = 30 ˚C X = 4,5 г/л КУО $_{ст. м.}$ < 1
К6.3. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в II інокуляторі.	Температура Час pH Концентрація біомаси	pH-метр, Термометр Годинник	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	pH =7,2, τ = 24 год, t = 30 ˚C X = 4,5 г/л КУО $_{ст. м.}$ < 1
К6.4. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в III інокуляторі	Температура Час pH Концентрація біомаси	pH-метр, Термометр Годинник	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	pH =7,2, τ = 24 год, t = 30 ˚C X = 4,5 г/л КУО $_{ст. м.}$ < 1

К6.5. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в посівному апараті	Температура Час pH Концентрація біомаси	pH-метр, Термометр Годинник	Під час вирощування посівного матеріалу в посівному апараті	pH =7,2, τ = 24 год, t = 30 ˚C X = 4,5 г/л КУО $_{ст. м.}$ < 1
К7.1., К7.2., К7.3., Технологічний та мікробіологічний контроль при виробничому культивуванні.	Температура Час pH Концентрація біомаси	pH-метр, Термометр Годинник	Під час вирощування посівного матеріалу в ферментаторі	pH =7,2, τ = 72 год, t = 30 ˚C X = 6 г/л КУО $_{ст. м.}$ < 1

7.2. Мікробіологічний контроль

Здійснюється на основній стадії проведення процесу ферментації пробовідбірники. Для того, щоб при відборі проб до апарату не потрапляла стороння мікрофлора з оточуючого середовища, пробовідбірники оснащені спеціальною арматурою. Перевіряють проби у центральній заводській лабораторії шляхом висіву на МПА та прямим мікроскопіюванням.

Для перевірки застосовують „Чашечний метод”. Цей метод знайшов широке застосування для встановлення кількості мікроорганізмів у натуральних та синтетичних субстратах. Вважають, що кожна жива клітина при посіві на щільне поживне середовище утворює колонію. Виконання аналізу включає три етапи: приготування розведень (Метод Коха), посів на щільне поживне середовище у чашках Петрі, підрахунок колоній. При виробництві дріжджів при мікробіологічній перевірці обладнання, приміщень, стерильного поживного середовища, повітря у пробах повинна бути відсутня будь-яка мікрофлора. При перевірці чистоти маточної культури та культуральної рідини під час основної ферментації, у пробах повинні виявлятися лише колонії біологічного агента , в іншому випадку продукція вважається бракованою.

7.3. Показники росту та синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають за допомогою фотоелектрокалориметра (ФЕК-2). На довжині хвилі λ=540 мкм, виділеної світлофільтром, вимірювали оптичну щільність розчину і потім по градуйованій кривій визначали концентрацію біомаси.

Правила роботи на фотоелектроколориметрі та порядок вимірювання величини світлорозсіювання детально описані в інструкції, прикладеній до приладу. В світловий потік по черзі поміщають контрольну кювету з поживним середовищем, щодо якої проводять вимірювання і досліджувану кювету з суспензією. Фіксують показники реєструючого приладу в одиницях оптичної щільності. Вимірювання проводять по 3 рази, остаточне значення визнають як середнє арифметичне з отриманих значень. Для визначення концентрації біомаси 53 будується градуйована крива, для цього використовується ряд розчинів з відомими концентраціями.

Використовуючи ту ж кювету і на тій же довжині хвилі визначають оптичну щільність досліджуваної дріжджової суспензії і по градуйованій кривій знаходять концентрацію в одиницях, г/л. Одержану залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат отримані дані з ФЕК, а на осі абсцис – кількість клітин, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л.

7.3.2. Концентрація цільового продукту

Кількісно визначають мікробіологічно; колориметрично за забарвленим продуктом мальтольної проби. Ідентифікують за утворенням фіолетового забарвлення при додаванні до розчину субстанції реактиву Лінга; за утворенням фіолетово-червоного забарвлення при додаванні до розчину субстанції α-нафтолу і натрію гіпобромідy в лужному середовищі; розчин субстанції дає характерну реакцію на сульфат-іони; при нагріванні препарату з 0,5 М розчином натрію гідроксиду утворюється мальтол (α-метил-β-окси-γ-пірон), який утворює фіолетове забарвлення з розчином ферум (III) хлориду в кислому середовищі (мальтольна проба).

7.3.3. Концентрація джерела вуглецю та азоту

для аналізу беруть рівні об'єми (по 20 мл) розчинів Фелінг I та II і цукру. Загальний об'єм суміші повинен бути завжди 60 мл. Суміш кип'ятять рівно 3 хв. Випадає червоний осад оксиду міді (I), який відфільтровують, промивають та розчиняють сульфатом заліза (III) в присутності сірчаної к-ти: при цьому оксид міді (I) кількісно окислюється трьохвалентним залізом, відновлюючи його в двохвалентне по р-ніюCu2O+Fe2(SO4)3+H2SO4=2 CuSO4+2 FeSO4+H2O

К-сть сульфату заліза (III), еквівалентне к-сті оксиду міді (I) визначають титруванням перманганатом калію, який окислює його в сульфат заліза (III).

2 KMnO4 + 10 FeSO4 + 8 H2SO4 = 5 Fe2(SO4)3 + K2SO4 + 2 MnSO4 + 8 H2O

За цим методом можна визначити вміст мальтози, глюкози та інвертного цукру. К-сть цукру в аналізованій пробі повинно бути не менше 10 і не більше 100 мг. Оптимальний вміст цукру лежить в межах 40-60 мг (0,2-0,3 % концентрація).

Техніка визначення.В конічну колбу відмір. 20 мл цукрового розчину і по 20 мл Фелінг I і II. Суміш переміш, нагрів. до кипіння і кип 3 хв. Після цього приступають до фільтрації. Повністю зливають синю рідину на фільтр, в колбу зразу налив 30-60 мл гарячої дист води, осаду дають відстоятися, а потім промивну воду також переводять на фільтр. Промивку повторюють 2-3 рази, а потім осад в колбі промивають 15-20 мл розчину залізо амонійних галунів. Після цього зміюють колбу на чисту і розсин сульфату заліза переводять на фільтр. Потім колбу і фільтр промив хол дист водою. Фільтрат одразу титрують перманганатом калію до зміни зелен забарв на рожеве.

Визначення азоту за Несслером. Візьміть в пробірку 1 мл зразку культуральної рідини і, доливши до половини пробірки води, долийте 2-3 краплі реактиву Несслера, при цьому випадає характерний червоно – бурий осадок. Рівняння реакції таке:

$$NH_4CI + 2K_2(HgI_4) + 4KOH = [O\overset{Hg}{\underset{Hg}{}}NH_2]I\downarrow + KCI + 7KI + 3H_2O$$

У випадку надто великої концентрації йону NH_4^+ реакція не вдається, так як осадок розчинний в надлишку солі амонію.

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

При виробництві субстанції антибіотика бацитрацин в навколишнє середовище виділяються тверді, рідкі та газоподібні відходи, тому потрібно організовувати заходи для їх знешкодження.

Технологічний процес виробництва субстанції бацитрацину здійснюється відповідно до вимог промислового регламенту при суворому дотримані параметрів, зазначених у регламенті, дотриманні технологічних інструкцій, інструкцій з охорони праці, виробничої санітарії та пожежної безпеки. У виробництві субстанції використовуються пожежонебезпечні та токсичні речовини (біомаса, відпрацьовані мийні розчини, а також залишки екстрагентів).

На біотехнологічних заводах значне газовиділення спостерігається з ферментаційної апаратури, а також сушильних апаратів. Газові викиди з ферментаторів містять живу мікрофлору та багато інших біологічно активних сполук, тому їх чищення вважається необхідним та важливим.

8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Стічні води біотехнологічних підприємств можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху їх стерилізують та нейтралізують. У подальшому їх спрямовують на очисні споруди. Спочатку здійснюють механічне очищення: проціджування крізь сітки, фільтрування, відстоювання, обробку в гідро циклонах, флотацію. Ступінь очищення досягає 50…70%. Кінцевою стадією очищення може бути хімічна обробка води: вапном, хлорування, озонування. Ступінь очищення 80…90%.

Замість хімічної оброблення може бути запроваджено фізико-хімічне очищення з використанням адсорбентів. Існують процеси, основані на ультрафільтрації, зворотньому осмосі, дистиляції.

Далі ці води спрямовують у загальну каналізацію. Система каналізування розділена на промислову та побутову. Побутова передбачає надходження стоків на жироуловлювач, касету фільтрації, відстійники, каналізаційну насосну станцію та далі на очисні споруди. Не дозволяється скидати у міську каналізацію стічні води підприємства:

- ступінь очищення яких недостатня та забруднюючі речовини перевищують допустимі концентрації;
- стік атмосферних опадів та від території, яку поливають, якщо на скидання таких немає дозволу;
- горючі домішки та розчинні газоподібні речовини, взаємодія яких зі стічними водами може призвести до утворення емульсій, токсичних або вибухонебезпечних сумішей, а також велику кількість нерозчинних у воді речовин;
- речовини, які здатні захаращувати труби, колодязі, решітки або відкладаються на їх поверхнях (будівельне та побутове сміття, грунт, попіл, вату, ганчірки, солому, сніг, лід, харчові та тверді виробничі відходи, абразивні порошки та інші грубодисперсні зависі, гіпс, вапно, пісок, металева та пластмасова стружка, жири, смоли, мазут та ін.);
- речовини на які не встановлено гранично допустимі концентрації (ГДК) чи орієнтовно безпечні рівні впливу (ОБРВ) для водних об’єктів;
- речовини, які важко руйнуються, з підвищеною жорсткістю поверхнево активних речовин;
- стічні води в яких можуть міститися радіоактивні, токсичні речовини, солі важких металів та бактеріальні забруднення;
- стічні води інфекційних лікувальних закладів та відділень перед випуском у каналізацію мають бути знешкоджені та знезаражені з обов’язковою утилізацією або захороненням утворених осадів згідно з діючими нормативними документами;
- концентровані регенераційні суміші, маточні та кубові розчини;

- категорично забороняється скидати у каналізацію кислоти, розчинники, розчини, які містять або утворюють при змішуванні зі стічними водами: сірководень, оксид вуглецю, легко леткі вуглеводні та інші токсичні сполуки.

Система промислової каналізації включає масложиропліковловлювальну установку для попередньої очистки промислових вод з мийки автотранспорту, виробничого корпусу. Потім стічні води потрапляють відстійники, та каналізаційну мережу. На промисловому майданчику передбачений організований від дощових та талих вод з попередньою механічною очисткою та маслобензиноуловлюванням.

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Одним із способів знищення твердих відходів є спалювання сміття на звалищах відкритим способом. Дефект спалювання полягає в накопиченні великої кількості попелу, який містить чимало токсичних речовин та газоподібні викиди під час спалювання сміття небезпечні (часто виділяється діоксин).

Найбільш небезпечним є спалювання пластмас. Сміття обов'язково попередньо проходить сортування.

На мікробіологічних заводах значне газовиділення спостерігається з ферментаційної апаратури, а також сушильних апаратів. Газові викиди з ферментаторів містять живу мікрофлору та багато інших біологічно активних сполук, тому їх чищення вважається необхідним та важливим.

Очищення газових викидів здійснюють у декілька ступенів: у циклонах, у рукавних фільтрах, у пристроях мокрого очищення. Очищення викидів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням газів, зниженням вологості у волого відбійниках з подальшим нагріванням, щоб уникнути попадання крапельної вологи та змочування фільтрів.

Утилізація та знешкодженні невідповідної продукції, матеріалів та відходів підприємства проводиться згідно із Законами України «Про охорону навколишнього природного середовища», «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення», «Про відходи», Постановою КМУ від 03.08.98 р. №1218 «Про затвердження порядку розроблення, затвердження та

перегляду лімітів на утворення та розміщення відходів», затверджених наказом МОЗ України № 349 від 08.07.2004 р. та цим СТП.

Начальники структурних підрозділів основного виробництва несуть відповідальність за:

- обґрунтування утворення кількості відходів та звіт про їх утворення, який затверджує заступник генерального директора з виробництва;
- збір, розподіл, облік відходів у підрозділів;
- фактичне утворення відходів по підрозділу та передачу їх на проммайданчик, або склад сировини та матеріалів для тимчасового зберігання.

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Методи очищення викидів від газоподібних речовин за характером фізико-хімічнихпроцесів з очищуваними середовищами поділяються таким чином:

- промивання викидів розчинниками, що не сполучаються із забруднювачами (метод абсорбції);
- промивання викидів розчинами, що вступають в хімічну взаємодію з забруднювачами (метод хемосорбції);
- поглинання газоподібних забруднювачів твердими активними речовинами (метод адсорбції);
- поглинання та використання каталізаторів;
- термічна обробка викидів;
- осаджування в електричних та магнітних полях;
- виморожування.

8.2.4. Заходи щодо зменшення об’ємів відходів

Начальники допоміжних дільниць та лабораторій відповідають за збір, розподіл, накопичення відходів по видах та тимчасове зберігання їх у визначених місцях підрозділу, облік відходів по підрозділу та передачу їх для тимчасового зберігання на проммайданчик або склад сировини та матеріалів для подальшого знищення, або утилізації.

На рівні підприємства відповідальність за організацію проведення виробничого контролю за дотриманням установлених нормативів у галузі поводження з відходами несе головний інженер підприємства.

Керівники структурних підрозділів (крім офісних підрозділів) своїм розпорядженням призначають осіб відповідальних за збір, розподіл по видах, зберігання, облік та передачу відходів на проммайданчик, до складу сировини та матеріалів та згідно з конкретно розробленими СЗП. На виробничих дільницях відходи ідентифікуються за збираються в спеціальну тару (мішки, бочки, контейнери та т.п.) по їх видах, що тимчасово зберігаються у визначених ідентифікованих місцях. Не допускається змішування різних видів відходів під час зберігання та транспортування.

Відповідальні особи структурних підрозділів підприємства здійснюють облік фактично утворених відходів по видах та кількості з веденням журналу обліку та передачею їх на проммайданчик, до складу сировини та матеріалів.

Зібрані відходи зберігаються з додержанням санітарних та екологічних норм на спеціально обладнаному майданчику для тимчасового зберігання згідно схеми розміщення відходів на майданчику, затвердженої головним інженером підприємства. До утилізації та знешкодження відбракованої продукції, матеріалів, відходів підприємства залучаються сторонні організації, які мають відповідний дозвіл Міністерства екології та природних ресурсів України. При виборі організації обов’язково перевіряється наявність в організації ліцензії на діяльність по транспортуванню, зберіганню, знищенню та утилізації визначених типів відходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Аиба Ш., Хемфри А., Миллс Н*. Биохимическая технология и аппаратура. – М. – 1987. – 50 с.
2. *Беккер М. Е*. Введение в биотехнологию. – М.: Мир, 1978. – 74 с.
3. *Паренти Ф., Ланчини Д.* Антибиотики. – М.: Мир, 1985. – 272 с.
4. An expanded DOTS framework for effective tuberculosis control. – Geneva, World Health Organization, 2002 – 179 p
5. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing (WHO report 2006). Geneva: WHO, 2006. – 242 p.
6. World Health Assembly. Tuberculosis programme. –Geneva, 1993 – 201 p.
7. 4 *Madigan M; Martinko J.* Brock Biology of Microorganisms. – Washington, 2005. –251 p.
8. *Schatz, A., and Waksman, S. A*. Process. Social. Experiments. Biological. Medical. – N-Y, 1947. – 323 p.
9. US4009269 A, US 05/584. Antibiotic compositions and methods from *Streptomyces griseus* C-5/ Jan Ilavsky, Aris P. Bayan, William Charney, Hans Reimann. – Опубл. 22.02.1977.
10. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. «Высшая школа»-М,1988. – 448 с.
11. *Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Панфилов В.И*. Лабораторные и промышленные ферментеры. – М.: РХТУ, 2004. – 94 с.
12. *Егоров Н.С.* Биотехнология: проблемы и перспективы. – М.: Высшая школа, 1997. – 282 с.
13. http://www.sartogosm.ru/fermentery_bioreaktory.html. Каталог ферментерів
14. *Н.К. Блинова, Т.И. Дубенко, Ю.Р. Петькова, Н.А. Пироженко.* Внедрение международных стандартов системы экологического менеджмента на промышленных предприятиях Украины. / Под редакцией Е.И. Тихомировой.- Саратов, 2011- Т.2. – 470 с.
15. *Катлинский А.В., Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И./* Курс лекций по биотехнологии. – М.: Мир, 2005.-150 с.

16. Состояние, перспективы и проблемы подготовки инженеров-технологов для фармацевтической отрасли Украины // Фармацевтическая отрасль. – 2010. – №1 (18). – С.14-15.

17. *Кузьміна Г.І., Строкань А.П., Тарасенко Г.В.* Місце навчальної дисципліни «обладнання хіміко-фармацевтичних підприємств» в формуванні у студентів практичних навичок з енергозбереження та енергетичної ефективності //. вісник кнутд. - 2013. - №6. С. 337-343

18. *Сагайдак-Нікітюк Р. В.* Управління відходами в умовах фармацевтичної галузі на підставі логістичного підходу. Харків, 2012. 21с.

19. *Пальгунов П.П., Сумароков М.В.* Утилизация промышленных отходов. М.: Стройиздат, 1990. 352 с.