

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

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Олексюк Юлії Миколаївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез бацитрацину *Bacillus licheniformis*

керівник роботи Сулейко Тетяна Леонідівна, ас.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus licheniformis*, продукт: бацитрацин

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту, обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, ТЕО, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва, автоматизація ділянки виробництва, охорона довкілля, Графічна частина (апаратурна та технологічна схеми)

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема – 1 аркуш формату А1, апаратурна схема 3 аркуші формату А1, автоматизація ділянки виробництва – 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
РОЗДІЛ 8. Автоматизація ділянки виробництва	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	01.04.2021-08.04.2021	
2	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	01.04.2021-08.04.2021	
3	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	09.04.2021-15.04.2021	
4	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	09.04.2021-15.04.2021	
5	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	16.04.2021-22.04.2021	
6	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	16.04.2021-22.04.2021	
7	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	23.04.2021-29.04.2021	
8	РОЗДІЛ 8. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	30.04.2021-06.05.2021	
9	РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	07.05.2021-13.05.2021	
10	Графічна частина (апаратурна та технологічна схеми)	14.05.2021-20.05.2021	
11	Вступ, оформлення роботи	21.05.2021-28.05.2021	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Олексюк Ю.М. _____
(прізвище та ініціали)

Сулейко Т.Л. _____
(прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
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
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	15
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	16
3.1. Потреба у цільовому продукті	16
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	18
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	19
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	21
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	24
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	24
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	24
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	26
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	27
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	32
4.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	34
4.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання	35
4.2.2. Вибір способу виділення цільового продукту з супернатанту	37
4.2.3. Вибір способу сушіння та сушарки	39
4.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	41
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	44
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.	49

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	63
7.1. Мікробіологічний контроль	63
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	64
7.2.1. Концентрація біомаси	64
7.2.2. Концентрація цільового продукту	65
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	68
7.3. Показники якості готового продукту	70
7.3.1. Ідентифікація бацитрацину	70
7.3.2. Антимікробна дія.....	71
7.3.3. Вологість кінцевого продукту	71
7.4. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	73
РОЗДІЛ 8. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	83
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	87
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	87
9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	92
ЛІТЕРАТУРА.....	96

РЕФЕРАТ

Робота присвячена проектуванню ділянки виробничого біосинтезу одержання антибіотику бацитрацину з використанням штаму *Bacillus licheniformis* DW2. Даний штам синтезує цільовий продукт за коротший термін (34 год.) і на дешевшому середовищі (1,56 грн./л), по відношенню до інших порівнювальних продуцентів.

У роботі надано обґрунтування та викладено технологічний процес ділянки синтезу антибіотику бацитрацину з використанням штаму *B. licheniformis* DW2, який містить блок допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, а також розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії підготовки посівного матеріалу, вирощування культури у виробничому ферментері, центрифугування культуральної рідини, екстракцію н-бутанолом та сушіння, що наведені в технологічній та апаратурній схемах

Наведено склад поживного середовища для культивування *B. licheniformis* DW2. З урахуванням особливостей складу поживного середовища було запропоновано схему його підготовки та підібрано необхідні режими стерилізації. Розраховано кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Наведено опис основних стадій технологічного процесу із зазначенням параметрів контролю.

Робота складається зі вступу, дев'яти розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схем, схеми автоматизації ділянки виробництва) та списку використаної літератури з 56 найменувань. Загальний обсяг проекту – 99 сторінок, 12 рисунків, 18 таблиць, 4 креслення формату А1 та 1 креслення формату А3.

Ключові слова: антибіотик, *Bacillus licheniformis*, поживне середовище, біосинтез, н-бутанол, розпилююча сушарка.

ВСТУП

У сучасній біотехнології особливо актуальне питання активності, ефективності та специфічності антибіотиків, дослідження їх біосинтезу різними продуцентами, вивчення фізико-хімічних властивостей, механізму їх дії. Вирішення цих питань має не тільки фундаментальне, але й практичне значення з точки зору раціонального використання антибіотиків [1].

В останні роки в Україні спостерігається стійка тенденція до зростання травматизму та шкірних пошкоджень різної природи походження (ДТП, пожежі, бійки, катастрофи і т.д.).

Бацитрацин являє собою поліпептидний антибіотик, який синтезують різні штами *Bacillus licheniformis*. Лікарський засіб пригнічує формування оболонки бактеріальної клітини. Препарат демонструє активність по відношенню до грампозитивних і деяких штамів грамнегативних бактерій. Медикаментозний засіб використовують для попередження розвитку запально-інфекційних процесу при таких травмах, як подряпини, порізи і опіки першого ступеня [2].

Бацитрацин (діюча речовина препаратів «Баціліхін», «Цікатрін», «Полібактрін»), також відомий як харчова добавка E700, називають кормовим антибіотиком, оскільки цю речовину використовують в якості добавки до кормів для тварин [3].

Бацитрацин вперше виявили в продуктах метаболізму *Bacillus licheniformis* var Trasy 1 (одного зі штамів сінної палички) в 1945 році. Його також виділяє бактерія *Bacillus licheniformis*, яка трапляється в ґрунті і пташиному пір'ї [4].

Є відомості активність бацитрацину проти збудників гемолітичних стрептококових захворювань, газової гангрені і деяких інших бактерій, а також найпростіших [5].

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Олексюк Ю.М.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Сулейко Т.Л.					6	2
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						

ВСТУП

Бацитрацин використовується в якості антимікробного профілактичного і ростостимулюючого засобу при вирощуванні і кормленні тварин і птиці. Інколи його використовують для попередження некротичних ентеритів і респіраторних захворювань, в тому числі, з такими патогенезами, як *Clostridium perfringens*. Окрім того, під дією антибіотику тварини і птахи більше їдять і швидше набирають вагу [5].

Актуальністю теми є розробка оптимальної схеми біосинтезу антибіотику широкого спектру призначення, що є перспективним полегшенням лікування шкірних пошкоджень, отриманих в результаті травматизму та запобігання потраплянню інфекцій в рани. Також не менш важливим є розвиток сільського господарства, внаслідок використання бацитрацина в якості кормової добавки для тварин і птиці. Це є особливо перспективним в Україні, зважаючи на доступність сировини та чималий потенціал у цій галузі.

Новизною роботи є використання відходів харчового виробництва (соєвий та рапсовий жмих) як основних складових поживного середовища для синтезу антибіотику бацитрацину [6]. Саме використання жмиху різного складу дозволяє знизити собівартність продукції шляхом зниження вартості поживного середовища.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Бацитрацин (*Bacitracin*) – поліпептидний антибіотик, вироблений штамми бактерії *Bacillus licheniformis*, пригнічує синтез клітинної оболонки бактерій. Активний проти грампозитивних мікроорганізмів, таких як β-гемолітичні стрептококи, стафілококи, і деяких грамнегативних патогенів [2].

Бацитрацин був виділений з штаму *Bacillus licheniformis* в 1943 р. Свою назву він отримав на честь семирічної дівчинки Маргарет Трейсі, у якій був перелом ноги, а в рані була виявлена культура *Bacillus licheniformis*. Лікар, який займався лікуванням дівчинки, зауважив, що *B. licheniformis* здатні знищувати бактерії стафілокока [7].

Хімічна формула бацитрацину – $C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$ (рис.1.1).

Молекулярна маса бацитрацину – 1422,69 г / моль (наведені дані для стандартних умов (25 °С, 100 кПа)).

Температура плавлення – 221 – 225 °С [8].

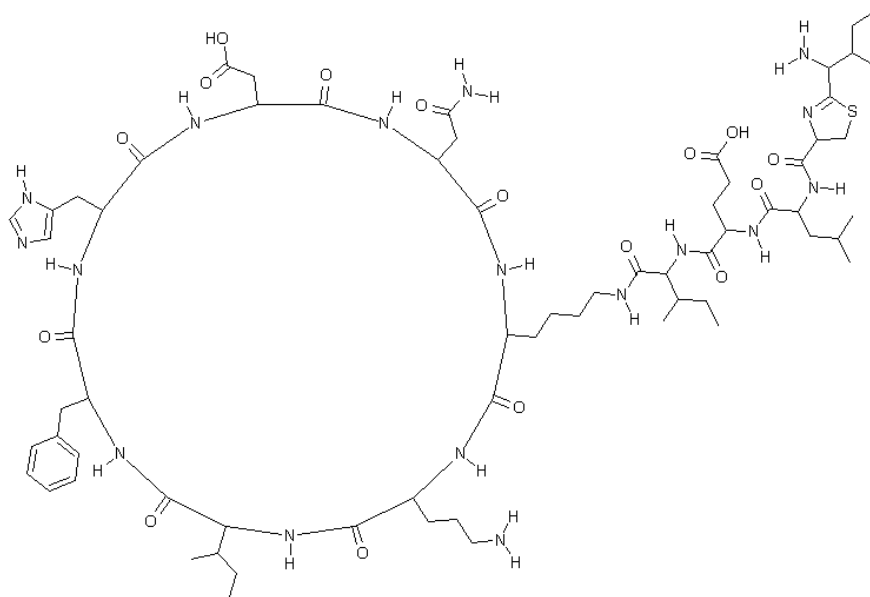


Рис. 1.1. Структура бацитрацину

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Олексюк Ю.М.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Сулейко Т.Л.					8	3
Реценз.					9		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.	Пирог Т.П.						

Біологічний механізм пов'язаний зі здатністю впливати на рибосоми мікроорганізмів з утворенням аномальних білків, що незворотно інгібує життєдіяльність мікробних клітин і приводить до їхньої загибелі (бактерицидна дія). Ефективний відносно багатьох аеробних грампозитивних і деяких грамнегативних бактерій. Має постантибіотичний ефект [9].

Бацитрацин – антибіотик, який використовується як добавка до корму для домашньої птиці, телят, ягнят і тварин. Бацитрацин в поєднанні з іншими антибіотиками, такими як *Polymyxin B* і *Neomycin* має сильну антимікробну діяльність. Добавка бацитрацина з Zn в курячий корм значно підвищує збільшення ваги, швидкості росту і ефективність використання корму. Бацитрацин з Zn також використовується в медицині, але він має обмежене клінічне застосування. Комерційний фармацевтичний бацитрацин–цинк містить 4–10% Zn. Його вводять в якості місцевого антибіотика при лікуванні хірургічних інфекцій. Він може бути використаний для лікування пневмонії, менінгіту, хронічного синуситу і остеомієліту. Він не поглинається шлунково-кишковим трактом, таким чином цілком доцільним є його використання при лікуванні шлунково–кишкових інфекцій [10].

Бацитрацин активний проти збудників гемолітичних стрептококових захворювань, газових гангрен і деяких інших бактерій, а також простіших. Він не викликає гемолізу, і вчені розглядали його як перспективний антибіотик. Однак подальші дослідження показали, що бацитрацин небезпечніший багатьох інших антибіотиків: він здатний викликати алергію, нефротоксичний, а в деяких випадках при внутрішньому введенні викликає некроз тканини. На даний час його використовують в основному в сільському господарстві або в якості порошків, мазі або розчинів для зовнішнього застосування.

Бацитрацин добре розчиняється в воді. Він стабільний в кислому середовищі, але нестабільний у лужному, також практично не накопичується в тканинах організму, погано всмоктується в шлунково-кишковому тракті, і при пероральному застосуванні діє в основному в ньому. Це означає, що бацитрацин здатний пригнічувати мікрофлору кишечника або сприяти зміні її складу.

Бактерії, а також збудники грибкових захворювань нерідко набувають стійкість до бацитрацину, причому це відбувається доволі швидко. Так з'являються штами патогенів, які стійкі до цього антибіотика [11].

Деякі сучасні дослідження показали, що бацитрацин запускає процес руйнування молекул ДНК і РНК. Однак такі результати були отримані в штучних умовах. Іншими словами, ці дані обумовлюють необхідність подальших досліджень бацитрацину і дозволяють припускати, що він здатний пошкоджувати молекули-носії генетичної інформації, але не є доказом наявності таких властивостей у даного антибіотика. Крім того, під дією цього антибіотика тварини і птиця більше їдять і швидше набирають масу [11].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Найчастіше використовують штам *B. licheniformis* DW2 з різними варіантами удосконалення (введення певних геномних послідовностей) [6, 12]. У таблиці 2.1 наведено порівняння складу поживного середовища для одержання антибіотику бацитрацину різними штамми *B. licheniformis*.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів бацитрацину

Продуцент	Склад поживного середовища (г/л)	Умови культивування	Конц.	Активність	Джерело
<i>Bacillus licheniformis</i> DW2	Соевий жмих – 100 г/л Крохмаль кукурудзяний – 45 г/л CaCO ₃ – 6 г/л (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1 г/л L-орнітин – 40 мг/л	37°C 230 об/хв 48 год	–	950 од/мл	[12]
<i>Bacillus licheniformis</i> DW2	Соевий жмих – 70 г/л Рапсовий жмих з низьким вмістом білку – 20 г/л Крохмаль кукурудзяний – 45 г/л CaCO ₃ – 6 г/л (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1 г/л	37°C 300 об/хв 34 год	–	910,4 од/мл	[6]
<i>Bacillus licheniformis</i> BCL-21	Пшеничні висівки – 150 L-глутамінова кислота – 5 Глюкоза – 0,5 KH ₂ PO ₄ – 0.5 K ₂ HPO ₄ – 0.5 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0.2 MnSO ₄ ×H ₂ O – 0.01 NaCl – 0.01 FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0.01 CuSO ₄ ×7H ₂ O – 0.01 CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0.015	pH 8.0, T=37°C, тривалість культивування 48 год, швидкість перемішування 150 об/хв	8,5 г/л	295 од/мл	[10]

Примітки. «–» – дані не наведено

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Олексюк Ю.М.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				11	4
Реценз.					12		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА							

З таблиці 2.1 бачимо, що один з можливих продуцентів синтезує антибіотик з найнижчою активністю (295 од/мл) серед порівнювальних – *Bacillus licheniformis* BCL-21. Тож надалі будемо порівнювати дані робіт, що стосуються штаму *B. licheniformis* DW2 [6, 12].

На наступному етапі порівнювали вартість поживних середовищ (табл. 2.2) з метою визначення їх рентабельності для культивування того чи іншого продуцента цільового продукту.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживних середовищ для культивування *Bacillus licheniformis* DW2

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus licheniformis</i> DW2 (2019)	Соевий жмих – 100,0	11,0	1,1	1
	Крохмаль – 45,0	13,0	0,59	2
	CaCO ₃ – 6,0	13,0	0,08	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,0	6,60	0,001	2
	L-орнітин – 40 мг/л	1100,0	0,04	3
	Вартість 1 л середовища — 1,8 грн			
<i>Bacillus licheniformis</i> DW2 (2017)	Соевий жмих – 70,0	11,0	0,77	1
	Рапсовий жмих з низьким вмістом білку – 20,0	6,0	0,12	1
	Крохмаль – 45,0	13,0	0,59	2
	CaCO ₃ – 6,0	13,0	0,08	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,0	6,60	0,001	2
	Вартість 1 л середовища – 1,56 грн			

Примітки. 1 – <https://flagma.ua/>; 2 – <https://prom.ua/>; 3 – <https://shop.hlr.ua/ornitin-monogidhlorid-l-chda-98434.html> (ціни взято як середні з даних платформ)

З табл. 2.2 бачимо, що вартість середовища сильно не відрізняється. Тому, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розраховували умовну вартість 1 од активності цільового продукту (табл. 2.3).

Умовна вартість 1 од активності продукту при культивуванні *Bacillus licheniformis* DW2

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність од/мл	Умовна вартість 1 од цільового продукту, грн/од	Тривалість культивування, год	Активність утвореного продукту за год, од/год
<i>Bacillus licheniformis</i> DW2 (2019)	1,8	950	0,0019	48	19,8
<i>Bacillus licheniformis</i> DW2 (2017)	1,56	910,4	0,0017	34	26,8

Економічна складова у виробництві продукту відіграє суттєво важливу роль, а саме чим нижча собівартість кінцевого продукту, тим дешевша технологія виробництва і, відповідно, – більший прибуток виробнику. Ми бачимо, що різниця у собівартості незначна, але зважаючи на тривалість культивування обираємо 2^й варіант середовища [6]. Отже, з табл 2.3 бачимо, що ефективнішим є виробництво антибіотику бацитрацину, використовуючи штам *B. licheniformis* DW2 за умов росту на соєвому та рапсовому жмиху [6].

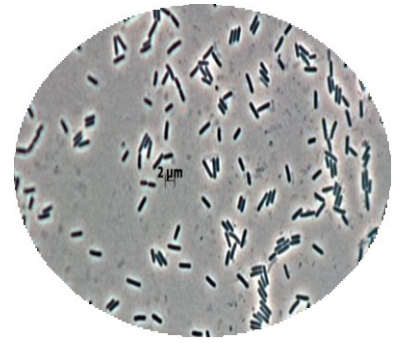
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки продуцента бацитрацину

Bacillus licheniformis – паличкоподібна (рис. 2.1.), грампозитивна бактерія, здатна утворювати спори [13]. Розміри клітин 0,6–0,8x1,5–3,0 мкм. Спори зазвичай еліпсоїдної або циліндричної форми, можуть розміщуватися центрально, парацентрально чи субтермінально. [14].

Великі колонії пухирчастої форми (рис. 2.2.), утворюють складочки після висихання, непрозорі, з віком тьмяніють і утворюють шорстку поверхню. Мають волосоподібні вирости («лихеніформні»), сильно прикріплені до агару, межі яких змінюються від хвилеподібних до фімбріат. Колір колоній білуватий і може стати коричневим з часом [14].



*Рис. 2.1. Колонії *Bacillus licheniformis* на кров'яному агарі [13]*



*Рис. 2.2. Клітини *Bacillus licheniformis* [14]*

Оптимальна температура росту – 50 ° С, але виживає і при набагато більш високих температурах. Оптимальна температура для секреції ферменту – 37 ° С. Оптимальний рівень рН 7,0–8,0. Ця бактерія може вижити в суворих умовах, перетворившись у спорову форму. Факультативний анаероб. Каталазопозитивна бактерія. Здатна до гідролізу крохмалю, сечовини і ескуліну. Може засвоювати нітрати. Не здатна до деградації тирозину. Ферментують з утворення кислоти глюкозу, манозу, фруктозу, рибозу, целобіозу, трегалозу, мальтозу, туранозу. Толерантна до вмісту хлориду натрію у концентрації 1–9% у середовищі культивування [14].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно з дев'ятим виданням керівництва Бергі з систематики бактерій *Bacillus licheniformis* належить:

Царство: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *Licheniformis*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Нераціональне і нерозсудливе використання антибіотиків-стимуляторів росту для сільськогосподарських тварин привело до втрати антимікробної чутливості мікроорганізмів, збудників основних зоонозних інфекцій, таких як сальмонельоз, колібактеріоз, кампілобактеріоз, ентерококоз, а відтак, до передачі антибіотикорезистентних штамів бактерій чи детермінантів резистентності від тварин до людини через харчовий ланцюг. Це несе найбільшу загрозу для гуманної медицини через поширення штамів мікроорганізмів, резистентних до антибіотиків, які широко використовуються в хіміотерапії людей [15].

Необхідно правильно і розсудливо ставитися до вибору кормових добавок. Адже правильне харчування і необхідні умови вирощування не завжди убережуть тварин від різноманітних хвороб. І також простіше попередити виникнення хвороби шляхом зміцнення імунітету, чим лікувати тварин антибіотиками, що може призвести до небажаних наслідків.

Правильний вибір антибіотиків-стимуляторів росту як кормових добавок має ряд переваг [16]:

- набір маси тіла тварин відбувається швидше;
- зменшується смертність;
- зменшується витрата кормів;

зменшується вірогідність захворюваності тварин.

3.1. Потреба у цільовому продукті

Бацитрацин – це антибіотик, що використовується у сільському господарстві як кормова ріст-стимулююча добавка. Він має переваги у порівнянні з іншими кормовими добавками [16, 17]:

- завдяки поліпетидній будові бацитрацин не всмоктується в шлунково-кишковий тракт тварин і тому не накопичується в

		М'ясі;			НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Олексюк Ю.М.					15	8
Перевір.		Сулейко Т.Л.				16		
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- не змінює чутливість грамнегативних кишкових мікрорганізмів щодо інших антибіотиків;
- окрім ріст-стимулюючого зменшує ймовірність захворювання тварин, що в подальшому дозволяє економити на ліках.

Слід зазначити, що бацитрацин відкрили ще у 1945 році [16] і уже у 1985 році був визнаний Європейською комісією з питань годівлі тварин як безпечна кормова добавка для домашньої птиці, свиней та кроликів [18]. Згідно Всесвітньої організації здоров'я тварин Бацитрацин визнаний як Veterinary Highly Important Antimicrobials (Високоважливий ветеринарний антимікробний препарат) [19].

Сільськогосподарський сегмент України доволі різноманітний, але для подальших розрахунків зупинимося на одному типі тварин. За статистичними даними більше третини м'ясної продукції, яку споживають українці, приходиться на свинину, що набагато більше, ніж на яловичину (близько 12 %). Крім того свинину, в тому числі і сало, можна вважати національним продуктом. Вищенаведене обумовлює доцільність застосування кормової добавки збагаченої бацитрацином саме для вигодовування свиней.

Згідно потреби корма для відгодівлі залежно від віку поросяти [20] та потреби антибіотику згідно рекомендацій [21] було складено узагальнюючу таблицю (табл. 3.1) для розуміння потреби бацитрацину на різних етапах відгодівлі свиней.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в бацитрацині

Вік поросяти	Доза корму на добу (г)	Доза антибіотику (г) на 1 тону корму
1 місяць	350	55
2 місяці	850	
3 місяці	1050	20
4 місяців	1550	
5 місяців	2250	
6 місяців	2550	
7 місяців	3200	

Для подальших розрахунків приймемо наступне: на початковому етапі росту поросяти (коли доза добавки 55 г на 1 тонну корма) візьмемо розхід корму на свиню – 1 кг на добу (так як у джерелі [20] вказана бажана доза корму для поросяти, то візьмемо з запасом, залишковий корм з добавкою можна використати для годівлі поросяти зі слабким імунітетом), а на етапі відгодівлі (3-7 місяців) – 3 кг корму на добу (знову візьмемо з запасом).

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Розрахунок будемо проводити для свиноферм України. Станом на 2020 рік загальна кількість свиней становила близько 5 млн голів [22-23]. Варто врахувати, що всі свиноферми не будуть годувати новим кормом, для початку виділять частину поголів'я, на яких зможуть оцінити можливість використання добавки і її ефективність в даних умовах. Якщо в подальшому дане господарство захоче використовувати корм з бацитрацином для годівлі і підвищення імунітету всіх свиней на фермі, тоді будемо збільшувати потужності нашого виробництва бацитрацину.

Також на ринку є інші антибіотики кормові добавки, що стимулюють ріст і забезпечують зміцнення імунітету, які можна використовувати протягом всього життя свиней [19, 24]:

- Лінкоміцин;
- Окситетрациклін;
- Тилозин;
- Віргініаміцин.

Тож, зважаючи на широкий асортимент кормових добавок, будемо вважати, що лише 3% свиноферм будуть купувати і використовувати наш бацитрацин, тобто

$$5000000 \times 0,03 = 150000 \text{ свиней}$$

За даними про використання бацитрацину [18] необхідно 55 г добавки на 1 тонну корма протягом перших 2^х місяців (61 день) годівлі свиней і 20 г добавки на 1 тонну корму на решту періоду відгодівлі. Також варто

зазначити, що вік свині, коли вона досягає достатньої ваги для забою це 6-8 місяців. Візьмемо період годівлі свиней 7 місяців. Врахуємо, що 2 місяці – це 61 день (в середньому), а 5 місяців – 152 дні (в середньому). Маємо:

$$\begin{aligned} & \frac{150000 \text{ свиней} \times 61 \text{ день} \times 1 \text{ кг корму на добу}}{1000} \times 55 \text{ г добавки} \\ & + \frac{150000 \text{ свиней} \times 152 \text{ дні} \times 3 \text{ кг корму}}{1000} \times 20 \text{ г добавки} \\ & = 503,25 + 1368 = 1871,25 \text{ кг добавки/рік} \end{aligned}$$

Округлимо до 1880 кг добавки на рік.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення свиноферм України кормовою добавкою, необхідно отримувати 1880 кг антибіотика на рік.

Розрахуємо, скільки саме культуральної рідини необхідно отримати за цикл ферментації, для подальшого розрахунку кількості стадій приготування посівного матеріалу.

Зі статті [6] відомо, що в культуральній рідині після завершення процесу культивування *Bacillus licheniformis* DW2 міститься антибіотик з активністю 910,4 од/мл. Активність не дає розуміння про кількість одержаного антибіотика. В зазначеному джерелі не вказана інформація про концентрацію цільового продукту, тому було прийнято рішення проаналізувати статті про синтез бацитрацину різними штамами *Bacillus licheniformis*. Загалом у джерелах міститься інформація про активність [25-27], так як саме цей показник є ключовим в оцінці ефективності антибіотика. Але у давніших джерелах [10, 28] є відомості про концентрацію бацитрацину – 782 мг/л за 52 год культивування і 8,5 г/л за 48 год культивування відповідно. Але активність такого антибіотику була низька – 250 од/мл [10], у іншому випадку [28] цікавила лише концентрація бацитрацину.

Зважаючи на обмежені дані і на той факт, що середовище у обраному нами джерелі [6] сприяє синтезу антибіотику з вищою активністю, то візьмемо, що кінцева концентрація бацитрацину після $T_{\Phi} = 34$ год культивування штаму *Bacillus licheniformis* DW2 становить 3,5 г/л. (Це

необхідно для приблизного розрахунку потужності виробництва). Вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{ГП}$ складає частку 0,95.

Для проведення подальших розрахунків прийемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 34 + 10 = 44 \text{ год,}$$

де $T_{ф}$ – час культивування; $T_{по}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

K_1 – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) прийемо $K_1 = 1,1$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту, частка $E_{св} = 0,15$.

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 330 ($T_{рд}$).

При кількості трудоднів рівному 330, кількість продукту на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = \frac{G_{нт}}{T_{рд}} = \frac{1880}{330} = 5,7 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_B = 15\%$):

$$G_{пд} = \frac{G_{нтд}}{1 - E_{св}} = \frac{5,7}{1 - 0,15} = 6,7 \text{ кг/добу}$$

Кількість антибіотику за цикл:

$$G_{цк} = \frac{G_{пд} \times T_{цф}}{24} = \frac{6,7 \times 44}{24} = 12,3 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times G_{цк} \times CP_{ГП}}{P_{кр}} = \frac{1,1 \times 12,3 \times 0,95}{3,5} = 3,67 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$K_{\text{ц}} = \frac{G_{\text{нт}}}{G_{\text{цк}}} = \frac{1880}{12,3} = 152,8 \text{ циклів}$$

Приймаємо 153 цикли.

При одержанні культуральної рідини необхідно також врахувати її втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, приймаємо значення 1%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{3,67}{1 - 0,01} = 3,7 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{\text{зф}} = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_{\text{зф}}} = \frac{3,7}{0,6} = 6,2 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{нф}} = 6300 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{V_{\text{нф}}} = \frac{3700}{6300} = 0,59$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері об'ємом $V_{\text{ф}} = 6300 \text{ л}$.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 6% від об'єму поживного середовища [6].

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс}} = \frac{V_{\text{ф}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{3700}{1 + 0,06} = 3490 \text{ л}$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,06).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{псф}} = 3700 - 3490 = 210 \text{ л}$$

Для одержання 210 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати

в результаті краплевиносу через колектор, які становлять від 1%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{210}{1 - 0,01} = 212 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{па}} = 212$ л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{212}{0,6} = 353 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{гпа}} = 400$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{212}{400} = 0,53$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 6% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{212}{1 + 0,06} = 200 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,06).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 212 - 200 = 12 \text{ л}$$

Для одержання 12 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{12}{1 - 0,01} = 12 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{па}} = 12$ л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{12}{0,6} = 20 \text{ л}$$

Приймаємо стандартний ферментер $V_{\text{нпа}} = 20$ л.

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 6% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{12}{1 + 0,06} = 11,3 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,06).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 12 - 11,3 = 0,7 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пм2}} = 0,7$ л можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,1$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{700}{750 \times 0,1} = 9,3$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 10 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу бацитрацину у ферментері об'ємом 6300 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оптимальними умовами росту *B. licheniformis* DW2 є температура 37°C, та рівень рН 7.5 [6].

Максимальний вихід антибіотику відбувається саме у стаціонарній фазі росту, тому більш доцільним буде використання періодичного способу культивування.

Більш повне споживання субстрату мікроорганізмами можна досягти під час періодичного процесу, внаслідок того, що субстрат вноситься лише один раз і споживається продуцентом протягом усього періоду культивування [29].

Існує декілька варіантів проведення процесу культивування: поверхнево і глибинно. Розглянемо кожен з них і оберемо, той що більше нас задовольнить.

При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу зіткнення поживного середовища з повітрям. Такий спосіб культивування мікроорганізмів застосовується як в лабораторних умовах, так і в промислових масштабах. Недолік поверхневого способу – необхідність встановлення кювет, роботу з якими важко механізувати [29].

Глибинне культивування мікроорганізмів має ряд переваг перед поверхневим, а саме: дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити низькопродуктивну ручну працю, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування збільшується питома площа контакту клітин продуцента з поживними речовинами у

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Олексюк Ю.М.						23	20
Перевір.	Сулейко Т.Л.					24		
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

середовищі культивування, що дає можливість отримувати препарати з більшою питомою активністю [29].

Виходячи з вищеописаного, доцільно буде використовувати саме глибинний спосіб культивування, що має переваги перед поверхневим: висока ефективність і ступінь використання компонентів поживного середовища, стерильність, можливість контролювати співвідношення компонентів поживного середовища.

Досліджуваний штам DW2 є аеробом і тому потребує постійної аерації, що пояснює необхідність забезпечення аеробного способу культивування.

Передбачається попередня стерилізація поживного середовища і асептичне внесення біологічного агента. Адаже за оптимальних умов росту нашого продуцента (37°C і нейтральним рН) існує ризик контамінації середовища сторонньою мезофільною мікрофлорою. Також варто зазначити високий вміст термолабільних сполук (основні джерела азоту та вуглецю), що також може спричинити контамінацію.

Обґрунтування вибору ферментера

Вибір виробничого ферментера базується на особливостях способу культивування продуцента, про які були зазначено вище.

Основними вимогами до ферментаторів є асептичність умов культивування та достатній рівень аерації.

Для забезпечення аерації у нижній частині ферментера встановлюють барботер, а для вищого коефіцієнту масообміну біореактор повинен бути обладнаний механічним перемішувачем. Існує декілька типів перемішувачів, проте одним з найефективніших варіантів є мішалки саме турбінного типу. Турбінна мішалка підвищить диспергацію кисню в культуральній рідині, таким чином інтенсифікуючи аерацію [30].

При використанні турбінної мішалки є ймовірність виникнення кругового руху рідини в апараті, в результаті чого утворюється воронка, що створює застійні зони при перемішуванні. Для попередження подібного в

апараті на невеликій відстані від стінок встановлюються відбивні перегородки.

Зазначимо, що технологічний процес передбачає контроль рівня рН, тому необхідно, аби обраний нами ферментер був оснащений датчиком рН.

Основним параметром вибору ферментера є його об'єм – нам необхідний апарат на 6,3 м³ (адже, інших особливих вимог наш продуцент не вимагає). Типовий ферментер такого об'єму можна закупити у фірми Suryamani Glassed Steel Equipment Private Limited, адже дана фірма може виконати замовлення ферментерів різного об'єму.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Bacillus licheniformis DW2 – факультативний анаероб. Згідно інформації, наведеної в основній статті [6] для процесу біосинтезу антибіотика необхідна аерація, тому підготовка стерильного аераційного повітря для процесу культивування бактерії є необхідною.

У боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом для стерилізації повітря використовують УФ-лампи.

Забір атмосферного повітря для подальшої його очистки здійснюють за допомогою спеціального повітрязбірника на висоті 12 м від підлоги першого поверху будівлі. Це пов'язано з тим, що висота виробничої будівлі становить 10 м і для запобігання потраплянню забруднюючих часточок в повітрязбірник його розміщують на відстані 2 м від даху будівлі.

За допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності) стерилізують повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування. Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом та інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На даних фільтрах видаляється приблизно 95% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до

99,999% мікроорганізмів [29].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для того щоб обрати мийні та дезінфікувальні засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку площі виробничого приміщення. Будемо вважати, що на 1 м² підлоги та стін затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу. Для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці. Виробництво триває 330 трудоднів, отже необхідно підібрати 2 різних мийних засобів для оброблення поверхонь.

Для миття обладнання.

Для миття обладнання необхідно підібрати саме мийні засоби, тому що дезінфекція буде відбуватися під час стерилізації гострим паром. Тому можна обрати один засіб.

Для миття обладнання і комунікацій і тари доцільно використовувати мийний засіб Біомой або кальциновану соду, тому що вони є екологічно безпечнішими, дешевими та простими у використанні. Як і зазначалося раніше, для миття нам необхідні засоби, що зможуть ефективно впоратися саме з очисткою (залишки біомаси, жирне середовище), Біомой та кальцинована сода цілком впораються з цим завданням.

Для дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей.

Для миття та дезінфекції підлоги, стін, вікон та дверей варто обрати комплексні засоби, що забезпечать і очищення і дезінфекцію. Також, варто зазначити, що варто обрати засоби з пролонгованою дією (наприклад, при генеральному прибиранні) аби забезпечити ефективність протягом більш тривалого часу.

Як дезінфікуючий засіб обираємо Хлорантоїн та ДЕЗЕКОН, які є в переліку затверджених засобів «Державного реєстру дезінфекційних засобів України 2020 р.» [31]. Варто зазначити, що обрали засоби з різними діючими речовинами, аби попередити виникнення резистентності у мікроорганізмів. Хлорантоїн (діюча речовина 1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн – дихлорантин;

масова частка діючої речовини 21,5-23,5 %) має бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної респіраторно-синцитіальних, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, SARS, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні і фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) [32]. ДЕЗЕКОН (діючі речовини: комплекс четвертинних амонієвих сполук не менше 5,5%, в т.ч. алкілдиметилбензиламоній хлорид – 2,2%; октилдецилдиметиламоній хлорид – 1,65%; дидецилдиметиламоній хлорид – 0,825%; діоктилдиметиламоній хлорид – 0,825%) ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій (включаючи *P. aeruginosa* (Antibiotic resistant), MRSA, збудників туберкульозу), вірусів (включаючи віруси гепатитів, ВІЛ, герпесу, грипу, рота-, корона, хантавірус, вірусу *Avian influenza* (збудник пташиного грипу) і ін.), патогенних грибів (збудників кандидозів і дерматомікозів) і цвілі [33]. Обидва засоби ефективні за низьких концентрацій, мають IV рівень небезпеки, тривалий термін зберігання робочих розчинів.

До початку обрахунку витрат мийних та дезінфікувальних засобів необхідно обрахувати площі та об'єми миття. Почнемо з обладнання. З попередніх обрахунків наше обладнання складає: ферментер (6,3 м³), збірники для композицій для приготування середовища для біосинтезу (4 м³, 200 л та 30 л), посівний апарат (400 л), збірники для приготування середовища для вирощування інокуляту (160 л та 100 л) та інокулятора (20 л). Отже, загальний об'єм миття складає: $6300+4000+200+30+400+160+100+20=11210$ л.

Миття ферментера (6,3 м³), посівного апарату (400 л), інокулятора (20 л) та реакторів-збірників для приготування композицій відбуватиметься за допомогою СІР-мийки, тому що доволі великі об'єми. Об'єм мийного засобу складатиме близько 20 % кожного з відповідних об'ємів обладнання. Всього для одного циклу необхідно витратити приблизно $11210 \times 0,2 = 2242$ л робочого розчину мийного засобу, а для всього періоду виробництва –

$2242 \times 164 = 367688$ л (округлимо до 367700 л).

На наступному етапі варто врахувати приблизні площі для миття і дезінфекції. Наше виробництво включає наступні цехи: цех виробничого біосинтезу, цех підготовки посівного матеріалу, качалочна кімната та лабораторне приміщення для проведення різноманітних операцій, де знаходяться автоклави, бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю.

Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер ($6,3 \text{ м}^3$) та збірники для композицій для приготування середовища для біосинтезу (4 м^3 , 200 л та 30 л) приблизно становить $6 \times 5 = 30 \text{ м}^2$. Висота стін, що миється – 2,5 м. Загальна площа стін – $(6+5) \times 2,5 \times 2 = 55 \text{ м}^2$. Площа підлоги – 30 м^2 . Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено посівний апарат (400 л), збірники для приготування середовища для вирощування інокуляту (160 л та 100 л) та інокулятор (20 л) приблизно становить $4,5 \times 4,5 = 20,25 \text{ м}^2$. Висота стін, що миється – 2,5 м. Загальна площа стін – $(4,5+4,5) \times 2,5 \times 2 = 45 \text{ м}^2$. Площа підлоги – $20,25 \text{ м}^2$.

Оптимальна площа качалочної кімнати та лабораторії приблизно ставить $3 \times 5 = 15 \text{ м}^2$. Висота стін, що миється – 2,5 м. Загальна площа стін – $(3+5) \times 2,5 \times 2 = 40 \text{ м}^2$. Площа підлоги – 15 м^2 .

Узагальнені дані щодо розрахунку наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

**Розрахунок загальної площі приміщень для виробництва
антибіотику**

Приміщення	Обладнання	Площа приміщення, м^2	Площа стін для миття, м^2
Цех виробничого біосинтезу	Ферментер об'ємом 6300 л, реактори-змішувачі об'ємом 4 м^3 , 200 л та 30 л	30	55
Цех підготовки інокуляту	Посівний апарат об'ємом 400 л, реактори-змішувачі об'ємом 160 л та 100 л та інокулятор об'ємом 20 л	20,25	45
Лабораторія	Автоклави, бокси, термостати, холодильники, апаратура для	15	40

	проведення контролів, качалки		
Всього		65,25	140

На основі наведених вище даних, необхідно провести розрахунок кількості мийних та дезінфікувальних засобів для миття приміщень та обладнання.

Обладнання необхідно мити перед кожним циклом, плюс додатково один раз після закінчення виробничого процесу, тобто 164 рази.

Кількість трудоднів становить 330 днів. Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня – всього 330 разів. Перед кожним циклом проводять генеральне прибирання, під час якого також миють і дезінфікують стіни, двері та вікна. Кількість генеральних прибирань становитиме 164 рази. Чистота повітря в приміщеннях повинна відповідати встановленим нормам, отже, обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп – 1 годину після кожного генерального прибирання та 0,5 години кожного робочого дня.

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції наведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	11,21	164	1838,44 (округлимо до 1840)
Підлога	65,25	330	21532,5
Стіни, двері, вікна	140	164	22960

Таблиця 4.3

**Орієнтовний розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання
на 2020 рік**

№	Найменування підрозділів об'єкта	Кількість підрозділів	Площа, що підлягає дезінфекції, м ²		Дезінфекуючий засіб			Кратність обробок			Потреба в деззасобах, л (кг)			
			При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину, %	Норма витрати робочого розчину на м ²	На добу	На місяць	На рік	На одну обробку		На місяць	На рік
											При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні		
1	Стіни, підлога, стеля, вікна, двері	3	65,25	205,25	Хлорантоїн	0,2	100 мл	1	30	330	6,525	20,525	371	4449,25
					ДЕЗЕКОН	0,2	100 мл	1	30	330	6,525	20,525	371	4449,25
2	Обладнання і комунікації	2	11210 л	11210 л	Біомой	0,3	-	-	14	164	2242	-	30642	367700

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Культивування *B. licheniformis* DW2 проводять у поживному середовищі наступного складу (г/л) [6]: Соевий жмих – 70; рапсовий жмих з низьким вмістом білку – 20; Крохмаль кукурудзяний – 45; CaCO₃ – 6; (NH₄)₂SO₄ – 1.

Біосинтез здійснюють при температурі 37 °С впродовж 34 год. за швидкості перемішування 300 об/хв. За необхідності, під час культивування регулюють рівень рН в межах 7,2-7,8 за допомогою титруючих агентів (NaOH чи HCl).

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

На першому етапі, для приготування 0,6 л посівного матеріалу в колбах, компоненти поживного середовища необхідно розділити на композиції. Так як об'єми композицій будуть малими на цьому етапі стерилізація буде проходити у колбах в автоклаві. На етапі вирощування інокуляту використовується середовище LB [6]. Вирішуємо готувати дане середовище за складом, а не закупати готовий порошок.

Склад поживного середовища для підготовки посівного матеріалу в колбах (г/л):

триптон – 10;	}	Композиція I
дріжджовий екстракт – 5,0;		
NaCl – 10.	}	Композиція II

Композицію I складають термолабільні сполуки, тому стерилізуються окремо від солей (умови стерилізації – 112 °С (P=0,05 МПа) впродовж 30 хв).

Композицію II складає сіль (умови стерилізації – 131 °С (P=0,15 МПа) впродовж 40 хв).

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах та посівних апаратах

На другому та третьому етапі для одержання 11 л та 200 л посівного

матеріалу використовують інокулятор з об'ємом 20 л та посівний апарат об'ємом 400 л, відповідно. Стерилізацію композицій для цих стадій будемо проводити в залежності від об'єму композицій – і це можна здійснити в автоклаві, збірниках та апаратах. Необхідно компоненти поживного середовища розділити на композиції в залежності від їх фізико-хімічних властивостей.

Склад поживного середовища для підготовки посівного матеріалу в інокуляторі та посівному апараті (г/л):

триптон – 10;	}	Композиція I
дріжджовий екстракт – 5,0;		
NaCl – 10.	}	Композиція II

Композицію I складають термолабільні сполуки, тому стерилізуються окремо за інших (умови стерилізації – 112 °C (P=0,05 МПа) впродовж 30 хв).

Композицію II складає сіль (умови стерилізації – 131 °C (P=0,15 МПа) впродовж 40 хв).

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Виробничий біосинтез проходить у ферментаторі з об'ємом 6300 л. Робочий об'єм становить 3540 л, таку кількість поживного середовища стерилізують безпосередньо у ферментері та збірниках. Склад поживного середовища для виробничого біосинтезу (г/л):

Соевий жмих – 70;	}	Композиція I
Рапсовий жмих з низьким вмістом білку – 20;		
Крохмаль – 45;	}	Композиція II
CaCO ₃ – 6;		
(NH ₄) ₂ SO ₄ – 1.		

Композицію I складають термолабільні сполуки, тому стерилізуються окремо за інших (умови стерилізації – 112 °C (P=0,05 МПа) впродовж 30 хв). Варто зазначити, що перед стерилізацією композиції I одну зі складових –

крохмаль – попередньо заварюють.

CaCO₃ стерилізуємо окремо, тому що це малорозчинний компонент(умови стерилізації – 131 °C (P=0,15 МПа) впродовж 40 хв).

Композиція ІІІ – сіль (умови стерилізації – 131 °C (P=0,15 МПа) впродовж 40 хв).

Зазначимо, що для підтримки необхідного рівня рН (7,5) [6] забезпечимо технологію титруючими агентами – 6% розчини HCl і NaOH.

Отже, технологічна схема біосинтезу бацитрацину *B. licheniformis* DW2 передбачає наявність таких допоміжних робіт:

- Приготування 6% розчину хлоридної кислоти
- Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію
- Приготування та стерилізація поживних середовищ.

Додаткове обладнання:

- Збірник для приготування 6% розчину хлоридної кислоти
- Збірник з сорочкою для приготування 6% розчину гідроксиду натрію
- Збірники з сорочкою для приготування поживного середовища.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Для забезпечення оптимальних умов культивування продуцента необхідно підтримувати рівень рН на необхідному нам значення. Як титруючі агенти використовують розчини лугів чи кислот. У нашому випадку є важливим співвідношення C/N, тому необхідно підібрати титруючі агенти, що не будуть впливати на дане співвідношення (наприклад, NH₄OH, чи HNO₃, чи карбонові кислоти). Класичним варіантом є використання пари 6%-вих розчинів соляної кислоти та гідроксиду натрію.

Щодо піногасника – умови культивування продуцента передбачають використання низьких обертів мішалки, що не буде створювати піну. Тому зважаючи на це піногасник нам не потрібен.

4.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Варто зазначити, що при виділенні та очищенні антибіотику необхідно підбирати стадії і етапи так, щоб зберегти активність цільового продукту.

Тому підбір стадій здійснювали шляхом аналізу літературних даних [34, 35].

Тож після аналізу даних можна сформулювати наступну схему виділення та очищення бацитрацину:

- Відділення біомаси
- Екстракція за допомогою н-бутанолу
- Видалення бутанолу (шляхом упарювання)
- Сушіння.

Бацитрацин – це позаклітинний антибіотик. Тому першим етапом виділення і очищення є відділення біомаси, щоб в подальшому працювати лише з супернатаном, в якому власне і знаходиться наш цільовий продукт.

4.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Методами відділення біомаси від культуральної рідини є сепарування та центрифугування; фільтрація; осадження за допомогою флокулянтів; дистиляція; сублімація; зневоднення (випарювання, сушіння); ліофілізація; заморожування; осадження шляхом змін розчинності речовини; кристалізація; сорбція; екстракція; ультрафільтрація на мембранних фільтрах [36]. Варто відмітити, що цільовий продукт знаходиться власне у культуральній рідині (рідка фаза), тому відділення біомаси варто здійснити фізичними методами. Адже осадження та кристалізація може вплинути на активність антибіотику та ускладнити подальше його виділення. Також не варто використовувати методи, що задіюють зміну температур (випарювання, ліофілізація та заморожування), адже цільовий продукт знаходиться в рідкій фазі. Тому зупинимось на наступних фізичних методах та оберемо найоптимальніший для нашої технології: фільтрація, сепарування та центрифугування, ультрафільтрація на мембранних фільтрах. Так як це початковий етап, дорого вартісні методи відділення біомаси – ультрафільтрація на мембранних фільтрах – також не варто розглядати. Отже, залишилось обрати між фільтрацією та центрифугуванням. Розглянемо ці два методи детальніше.

Фільтрація – це розділення суспензії при її пропусканні через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування – отримання твердої або рідкої фази (коли одна з них є відходом), а також одночасне отримання твердої і рідкої фаз. Іноді для кращого перебігу процесу до суспензії додають коагулянти для кращої ефективності процесу. Також налипання твердої фази на фільтр (фільтруючу перегородку) спричинює зниження ефективності процесу. У такому разі необхідно або фізично звільнювати тверду фазу з фільтру або здійснювати заміну фільтруючого матеріалу [36, 37].

Центрифугування – це процес розділення неоднорідних систем (емульсій і суспензій) під дією відцентрових сил з використанням суцільних або проникних для рідини перегородок. Залежно від величини критерію розділення (Fr) центрифуги поділяють на звичайні ($Fr < 3500$) та надцентрифуги ($Fr = 3500-12000$). Останні називають ще сепараторами, якщо фактор розділення > 12000 , то такі центрифуги називають бактофугами. Перевагою центрифугування є висока інтенсивність та швидкість процесу, здатність до автоматизації, здатність до оброблення великих об'ємів суспензій та відсутність попередньої обробки культуральної рідини [36, 37].

Отже, проаналізувавши дані, варто обрати метод відділення біомаси, який забезпечить ефективність процесу, збереження рідкої фази для подальшої обробки, відсутність необхідності попередньої обробки культуральної рідини для збереження активності антибіотику та метод, що дозволить автоматизувати процес за великих об'ємів культуральної рідини. Обираємо метод центрифугування. Умови проведення 5000 g впродовж 20 хв.

Центрифуги також бувають різними. Нам необхідно обрати спираючись на об'єми оброблювальної культуральної рідини. Також важливо, щоб апарат був зручний у експлуатації – була можливість миття та стерилізації і контроль параметрів при центрифугуванні.

Беручи за основу вище сказане, нам підходить центрифуга Alfa Laval ВТРХ – особливістю є можливість підключення до СІР мийки, можливість

стерилізації та використання при потоковій швидкості культуральної рідини до 2000 л/год:



Рис 4.1. Центрифуга Alfa Laval VTPX [38]

4.2.2. Вибір способу виділення цільового продукту з супернатанту

Виділення антибіотиків із складної суміші речовин (у нашому випадку це культуральна рідина) представляє значні труднощі, оскільки для відділення та очищення цільового продукту білкової природи слід чітко дотримуватись певних умов для збереження активності антибіотику.

Підбір оптимальної схеми виділення та очистки є довготривалим процесом. Для збереження активності цільового продукту варто поєднувати декілька методів очистки.

Відділення білкових молекул можна здійснювати шляхом осадження, екстракції та афінної хроматографії. Варто відмітити, що потужності нашого виробництва доволі великі (1880 т на рік, або 12,3 кг за цикл), тому нам необхідно підібрати методи, що підходять для таких об'ємів. Варто відмовитись від методу афінної хроматографії, адже це доволі дороговартісний метод, який використовують для малих потужностей виробництва. Також через специфіку проведення цю процедуру доволі важко автоматизувати.

У нашому випадку виділення антибіотку відбуватиметься шляхом **екстракції органічними розчинниками.**

Вибір органічних розчинників є відповідальним моментом, адже правильний підбір забезпечить подальше простіше очищення цільового

продукту зі збереженням його активності. Ще в 50-х роках минулого століття [35] було встановлено, що саме екстракція за допомогою н-бутанолу є найбільш ефективним методом екстракції зі збереженням активності антибіотику. Після струшування, водна фаза зливається і піддається повторній подібній екстракції ще раз н-бутанолом [35].

Для процесу екстракції будемо використовувати рідинні екстрактори фірми ROUSSELET ROBATEL, Франція (рис. 4.2). Перевагою даного виробника є широка лінія екстракторів з різною продуктивністю, що дозволить обрати саме ту модель, що підходить під наші умови.

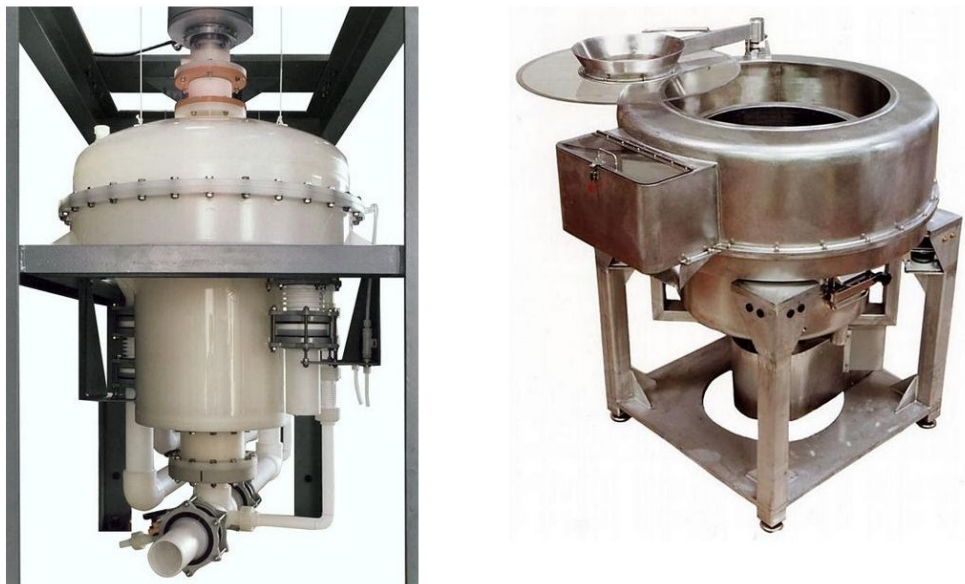


Рис 4.2. Екстрактор Liquid / liquid separator Model VXP 360P Kynar [39, 40]

Після другої екстракції водну фазу зливають і **упарюють для видалення органічного розчинника**. Варто зауважити, що при процесі упарювання варто слідкувати, щоб екстракт не став безводним, оскільки антибіотик швидко інактивується в безводному бутанолі. Тобто за необхідності, необхідно додавати воду очищену поки не буде видалено весь бутанол [35].

У промисловості все ширше застосовуються ротаційні вакуум-випарні

апарати безперервної дії, що характеризуються здатністю швидко концентрувати розчини з можливістю отримання сухих продуктів та високою інтенсивністю теплообміну. В апаратах даного типу, розчин, що концентрується, перебуває в зоні нагрівання короткий період (до декількох секунд) у невеликій кількості, і завдяки вакууму упарювання рідин відбувається за низької температури (35-50 °С) без розкладання термолабільних речовин.

Ротаційний вакуум-випарний апарат фірми «Агромаш» (Україна) (рис 4.3) застосовується для швидкого, безперервного й низькотемпературного концентрування рідин, що містять термолабільні компоненти.



**Рис 4.3. Ротаційний вакуум-випарний апарат, місткістю 1000 л
Виробник: ТОВ «Агромаш», Україна [41]**

4.2.3. Вибір способу сушіння та сушарки

Фінальний етап очищення антибіотику є процес сушіння. Сушіння – видалення рідини (вологи) з твердих та рідких матеріалів (продуктів, препаратів). Здійснюється за допомогою сушильних установок різного типу [36, 37].

Більшість антибіотиків в тому чи іншому ступені термолабільні, тому для їх висушування необхідно використовувати методи, що не призводять до втрати біологічної активності. Крім звичайних методів сушіння, широкого

поширення набуло ліофільне висушування препарату. Ліофільне сушіння – широко розповсюджений прийом, що проводиться при порівняно низьких температурах (від -8 до -12 °C). Висушування з використанням розпилюючої сушарки – прогресивний метод при роботі з великими кількостями антибіотику; розчин антибіотику пневматично розпилюється до дрібних крапель у камері зі струмом нагрітого повітря. Процес висушування антибіотику відбувається протягом декількох секунд. При цьому навіть термолабільні препарати не змінюють свої властивості. Метод завислого шару (сушіння у вакуум-сушильних шафах) застосовується для висушування зернистих та пастоподібних препаратів [42].

Так як наш антибіотик будемо використовувати в сухому вигляді і для зменшення кількості операції, варто обрати спосіб висушування з використанням розпилюючої сушарки. Адже у такому вигляді не треба буде стадія подрібнення, що спростить етап підготовки цільового продукту для використання у готовому лікарському засобі.

Підбір обладнання на даному етапі також залежить від об'ємів матеріалу, що буде надходити на сушіння.



Рис 4.4. Розпилююча сушарка [43]

4.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідними даними для даного розрахунку виступають кількість культуральної рідини, яка отримана з розрахунків для ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу *B. licheniformis* DW2 та втрати, вказані в техніко-економічному обґрунтуванні.

Отже, для розрахунку наявні такі вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини становить 3,7 м³;
2. Концентрація антибіотику дорівнює 3,5 г/л;
3. Втрати при виділенні становлять 15 %.

Таблиця 4.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 15 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
1	Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	3,7 м ³	-	3,7 м ³	Збірник КР, об'ємом 5 м ³
2	Відділення біомаси	Біомаса	144,3 кг	-	144,3 кг	Центрифуга, продуктивністю 2000 л/год
		Фільтрат	3555,7 л	1% (37 л)	3518,7 л	Збірник, об'ємом 4 м ³
3	Екстракція	Фільтрат	3518,7 л	-	-	Збірник, об'ємом 4 м ³
		Н-Бутанол	3500 л	-	-	Збірник, об'ємом 4 м ³
		Органічний екстракт	-	5% (180,5 л)	3429,5 л	Збірник, об'ємом 4 м ³
		Водна фаза	-	-	3408,7 л	Рідинний екстрактор продуктивністю 2м ³ /год
4	Концентрування та видалення бутанолу	Органічний екстракт	3429,5 л	-	-	Ротаційний вакуум-випарний апарат
		Водний концентрат антибіотику	-	2% (6,9 л)	336 л	Збірник, об'ємом 500 л

Закінчення табл. 4.1

1	2	3	4	5	6	7
5	Сушіння	Водний концентрат антибіотику	336 л (вміст антибіотику 13,2 кг)	-	-	Збірник, об'ємом 500 л
		Сухий антибіотик	-	4% (0,5 кг)	12,7 кг	Розпилююча сушарка продуктивність (по воді) 100 л/год
6	ПМВ	Сухий антибіотик	12,7 кг	-	-	-
		Упакований у флакони антибіотик	-	3% (0,4 кг)	12,3 кг	Ручне фасування

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, що використовується та зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт, виробничого біосинтезу та виділення антибіотика бацитрацину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування робочого миючого розчину	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
H-2 H-19 H-23 H-27 H-30 H-32 H-34 H-37 H-40 H-43 H-66	Насос відцентровий	11	Насос відцентровий Debem MB 120. Продуктивність 25,0 м ³ /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна). ²
ПЗ-3	Пристрій для забору повітря	1	Повітрязабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-4	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр CFM. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка, швидкість фільтрування – 2 м/с, Е = 75 %. Виробник: «General filter» (Італія). ³
К-5	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). ⁴
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁴

НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Олексюк Ю.М.		
Перевір.		Сулейко Т.Л.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.
				43
			Акрушів 5	
			Кафедра БТМ	

1	2	3	4
P-7	Ресивер	1	Ресивер РВ 900.10. Об'єм 900 л, робочий тиск 1,1 МПа. Виробник: «Remeza» (Білорусь). ⁴
T-8	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁴
Ф-9	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр (P)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁵
P-10	Реактор для соляної кислоти	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-300 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
P-11	Реактор-змішувач для гідроксиду натрію	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-300 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
P-12	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 6 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
P-13	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 8 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Ф-14 Ф-20 Ф-28	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтри (P)–SRF N. Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁵
I-15	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 40 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$, нержавіюча сталь 316L. Виробник: «Applikon Biotechnology» (Нідерланди) ⁶ (габаритні розміри в мм: висота 631, внутрішній діаметр 211)

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4
P-16	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
H-17 H-25	Насос гвинтовий	2	Гвинтові насоси Tarflo, серія X. Продуктивність 60 м ³ /год. Виробник: «Тарфло» (Україна) ⁷
P-18	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 160 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
ПА-21	Посівний апарат	1	Ферментер об'ємом 200 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$, нержавіюча сталь 304. Виробник: «Suryamani Glassed Steel Equipment Private Limited» (Індія) ⁸ (габаритні розміри в мм: висота з мотором 2395, висота без мотора 1080, внутрішній діаметр 1000, зовнішній діаметр 1100)
P-22	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 30 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
P-24	Реактор-змішувач для приготування карбонату кальцію	1	Реактор-змішувач об'ємом 3 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
P-26	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 2 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4
ФР-29	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 6300 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$, нержавіюча сталь 304. Виробник: «Suryamani Glassed Steel Equipment Private Limited» (Індія) ⁸ (габаритні розміри в мм: висота з мотором 4856, висота без мотора 2840, внутрішній діаметр 2000, зовнішній діаметр 2100).
Р-31	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 4 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Р-33	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Ц-35	Центрифуга	1	Центрифуга Alfa Laval ВТРХ, є можливість підключення до СІР мийки, можливість стерилізації та використання при потоковій швидкості культуральної рідин до 2000 л/год Виробник: Alfa Laval, Швеція ⁹
Р-36	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 4 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Е-38	Екстрактор	1	Рідинний екстрактор з нержавіючої сталі Model ВХР 360Р Кунар. Виробник: ROUSSELET ROBATEL, Франція ¹⁰
Р-39	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 4 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Е-41	Екстрактор	1	Рідинний екстрактор з нержавіючої сталі Model ВХР 360Р Кунар. Виробник: ROUSSELET ROBATEL, Франція ¹⁰

1	2	3	4
P-42	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 4 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
BBA-44	Вакуум-випарний апарат	1	Ротаційний вакуум-випарний апарат, місткістю 1000 л Виробник: ТОВ «Агроماش», Україна ¹¹
P-45	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 500 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
C-47	Сушарка	1	Розпилююча сушарка марки YC-SD-100 Виробник: Yenchen Machinery Co., Ltd, Китай ¹²
Ст-48	Стіл для ручного фасування	1	Стіл для ручного фасування антибіотику у флакони

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 1. <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», ємінісне обладнання), 2. www.debem.com.ua («Debem», насоси), 3. <http://www.air-filter.com.ua> («General filter», фільтри для повітря), 4. <http://www.vent-magazin.ru>, <http://www.dalgakiran.com.ua> («Далгакиран компресор Україна», обладнання для підготовки повітря), 5. <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря), 6. <https://www.applikon-biotechnology.com/> («Applikon Biotechnology», інокулятор 20 л), 7. <https://tapflo.ua/ua/products-2/screw-pumps#spetsialne-vikonannya> (гвинтовий насос) 8. <http://suryamani.in/> («Suryamani Glassed Steel Equipment Private Limited», посівний апарат 400 л, ферментер 6300 л), 9. <https://www.alfalaval.com/products/separation/centrifugal-separators/separators/btpx/> (центрифуга), 10. <http://www.rousselet-robotel.com/chemical-fine-chemical-pharmaceutical/liquidliquid-centrifugal-separators-type-bxp/> (рідинний екстрактор), 11. https://www.agro-mash.ru/0811_SER_vakuum_vypar_ap.html (упарювач), 12. https://www.yenchen.com.tw/en/product/Spray-Dryer/spray_dryer-331.html (розпилююча сушарка),

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

Технологічна схема біосинтезу антибіотику бацитрацину *B. licheniformis* DW2 включає в себе допоміжні роботи (а саме, приготування 6% розчину хлоридної кислоти, приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез та очищення цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу антибіотику бацитрацину *B. licheniformis* DW2 наведено у графічній частині роботи.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання персоналу

Власне підприємство забезпечує навчання персоналу. Існують наступні види навчань:

1. Основне навчання: проводиться один раз на рік; персонал ознайомлюється з теорією і практикою;
2. Вхідне навчання: проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду наймають нового співробітника;
3. Подальше навчання: здійснюється систематично з подальшим оцінюванням практичної ефективності проведених навчань.

ДР 1.1.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Для миття рук персоналу використовують мило туалетне та мило господарське, для дезінфекції – 76% етиловий спирт.

ДР 1.2. Приготування робочого розчину кальцинованої соди

Згідно попередніх розрахунків, необхідно приготувати 2250 л робочого розчину кальцинованої соди концентрацією 2,0 %. У реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 3 м³ об'ємно-ваговим дозатором вносять 45 кг кальцинованої соди і

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Олексюк Ю.М.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				48	13
Реценз.					49		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.					

додають 2205 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-1) подають пару для досягнення температури розчину 55-60°C, і вмикають перемішуючий пристрій (100-500 об/хв).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій

Розчин кальцинованої соди у концентрації 2 % (від ДР. 1.2) підігрітого до температури 50 – 60 °С застосовують для миття обладнання та комунікацій, а саме подаючи цей розчин від збірника (Р-1) відцентровим насосом (Н-2) по комунікаціям до відповідних апаратів. Миття здійснюють за допомогою системи СІР мийки протягом 1 год. Відпрацьований розчин після миття йде на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1). Для ополіскування в апарати по комунікаціях подається питна вода також через систему СІР. Далі після зливу вода також направляєється на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1).

ДР 1.3.2. Технічний огляд

З метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні, після миття та ополіскування ємкісного обладнання проводять його технічний огляд. У разі необхідності проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

На ємкісному обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і в операційному журналі фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв). Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск

в апараті до 0,2 МПа.

Тривалість операції становить 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають пару і нагрівають апарат до температури 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат (через нижній спуск або барботер), при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Необхідний об'єм атмосферного повітря забирають на висоті 12 м (ПЗ-3).

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через набивний фільтр (Ф-4), де відбувається затримка пилу та інших крупних часточок бруду (ступінь очищення $E = 75\%$). Фільтруючий матеріал – плетений алюмінієвий дріт.

ДР 2.3. Компресування повітря

На даному етапі відбувається стиснення повітря у компресорі (К-5) до температури 220-250 °С і тиску 0,4 МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

У теплообміннику (Т-6) температура повітря знижується до 25-30 °С.

Видалення зайвої вологи до вмісту $W = 60\%$ відбувається у ресивері-вологівідділювачі (Р-7).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря у теплообміннику (Т-8) нагрівають до температури 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів.

ДР 2.6. Головне тонке очищення повітря

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-9), в якому фільтрувальним матеріалом є нержавіюча стальна сітка. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-14, Ф-20, Ф-28). Фільтрувальним матеріалом є фторопласт. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища

Для приготування 15 л 6% розчину HCl , необхідно 2,5 л концентрованої 36% HCl і 12,5 л водопровідної води.

У збірник (Р-10) об'ємом 20 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 12,5 л питної води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 2,5 л 36% розчину HCl , вмикають перемішувач.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлужнення поживного середовища

Для приготування 15 л 6% розчину NaOH , необхідно 900 г кристалічного NaOH і 14,1 л водопровідної води.

На технічних вагах зважують 900 г кристалічного NaOH . Наважку поміщають в збірник (Р-11) об'ємом 20 л, додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 14,1 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішувач.

Стерилізація титруючого агенту проходить безпосередньо в збірнику (Р-11) під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C (за рахунок подачі пари в збірник) упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 707 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 707 мл поживного середовища наведено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 707 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 707 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Триптон	10,0	7,1	I	410,6
Дріжджовий екстракт	5,0	3,5		
Вода		400		
NaCl	10,0	7,1	II	296,4
Вода		289,3		

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I

На технічних вагах зважують 7,1 г триптону і 3,5 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 400 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних вагах зважують 7,1 г натрій хлориду. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 289,3 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 11,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 11,3 л поживного середовища наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 11,3 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 11,3 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Триптон	10,0	113	I	4520
Дріжджовий екстракт	5,0	56,5		
Вода		3955		
Конденсат		452		
NaCl	10,0	113	II	6780
Вода		5932,5		
Конденсат		678		

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I

На технічних вагах зважують 113 г триптону і 56,5 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор (Р-12) об'ємом 6 л додають 3955 мл водопровідної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-8) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Стерилізація композиції проходить безпосередньо в збірнику (Р-12) під тиском 0,15 МПа при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних вагах зважують 113 г натрій хлориду. Наважку поміщають у збірник (Р-13) об'ємом 8 л, додають 5932,5 л водопровідної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-13) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Приготовлену композицію подають у інокулятор (I-15) об'ємом 20 літрів. Стерилізація композиції проходить в інокуляторі (I-15) при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 198 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 198 л поживного середовища наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 198 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 198 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Триптон	10,0	1,98	I	79,18
Дріжджовий екстракт	5,0	0,99		
Вода		69,3		
Конденсат		7,9		
NaCl	10,0	1,98	II	118,82
Вода		103,95		
Конденсат		11,9		

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I

На технічних вагах зважують 1,98 кг триптону і 0,99 кг дріжджового екстракту. Наважки поміщають у збірник (P-16) об'ємом 100 л, додають 69,3 л водопровідної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (P-16) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Стерилізація композиції проходить безпосередньо в збірнику (P-16) під тиском 0,15 МПа при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних вагах зважують 1,98 кг натрій хлориду. Наважку

поміщають у збірник (Р-18) об'ємом 160 л, додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 103,95 л водопровідної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-18) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Приготовлену композицію подають за допомогою насоса (Н-19) у посівний апарат (ПА-21) об'ємом 400 літрів. Стерилізація композиції проходить в посівному апараті (ПА-21) при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.4. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 6300 л

Для проведення стадії виробничого біосинтезу необхідно приготувати 3490 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 3490 л поживного середовища наведено в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3490 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 3490 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Соевий жмих	70	244,3	I	1317,8
Рапсовий жмих з низьким вмістом білку	20	69,8		
Крохмаль кукурудзяний	45	157		
Вода		714,9		
Конденсат		131,8	II	2147,7
CaCO ₃	6	21		
Вода		1911,7		
Конденсат		215	III	24,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	3,5		
Вода		18,6		
Конденсат		2,4		

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції I

За допомогою об'ємно вагового дозатора у збірник (Р-26) об'ємом 2 м³

подають 244,3 кг соєвого жмиху, 69,8 кг рапсового жмиху з низьким вмістом білку, 157 кг кукурудзяного крохмалю та 714,9 л водопровідної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-26) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій. Інгрідієнти заварюють при температурі 80°C упродовж 30 хв, ретельно перемішують, уникаючи утворення великих грудок. Приготовлену композицію за допомогою насосу (Н-27) подають у попередньо простерилізований ферментер (ФР-29).

Стерилізація композиції проходить в збірнику (Р-26) при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції II

За допомогою об'ємно вагового дозатора у збірник (Р-24) об'ємом 3 м³ подають 21 кг кальцій карбонату та 1911,7 л водопровідної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-24) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Приготовлену композицію самоплином подають у попередньо простерилізований ферментер (ФР-29). Стерилізація композиції проходить безпосередньо в ферментері (ФР-29) під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції III

За допомогою об'ємно вагового дозатора у збірник (Р-22) об'ємом 30 л подають 3,5 кг амоній сульфату та 18,6 л водопровідної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-22) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Стерилізація композиції проходить безпосередньо в збірнику (Р-22) під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *B. licheniformis* DW2 зберігають у пробірках зі скошеним LB агаром у холодильнику при температурі 4 °С. Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять суворо в стерильних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Робочу культуру штаму DW2 отримують розсівами колекційної культури продуцента на чашки Петрі із агаризованим LB середовищем в асептичних умовах. Культуру на чашці Петрі вирощують при температурі 37°C протягом 24 год.

ТП 5.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі

Ізольовані колонії від ТП 5.2 в асептичних умовах пересівають стерильною петлею у пробірки з агаризованим середовищем. Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Для пересіву використовують колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 24 год при температурі 37°C.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу об'ємом 1 л із 410,6 мл розчину композиції I (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах вносять 296,4 мл розчину композиції II (від ДР 4.1.2). Розчин перемішують і розливають по 100 мл в сім стерильних качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою культурою *B. licheniformis* DW2, вирощену на середовищі LD, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини-продуцента (шляхом змивання культури), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (250 об/хв) при 37°C упродовж 48 год. Під час культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

Після завершення вирощування в асептичних умовах інокулянт з 7 колб переносять в засівну колбу об'ємом 1 л, перемішують, закривають пробкою.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

В інокулятор (І-15) зі стерильною композицією ІІ (ДР 4.2.2) подають композицію І (ДР 4.2.1).

Далі за допомогою засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 5.4). Включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в рубашку інокулятора (І-15) подають пару.

Культивування здійснюють при температурі 37 °С впродовж 48 год за швидкості перемішування 300 об/хв. За необхідності, під час культивування регулюють рівень рН в межах 7,2-7,8 за допомогою титруючих агентів (NaOH чи HCl). Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. У пробі відібраній на 48 годину культивування, концентрація біомаси повинна перебувати в межах 5,8-6,0 г/л.

ТП 5.6. Вирощування інокулянту в посівному апараті об'ємом 400 л

У посівний апарат (ПА-21) зі стерильною композицією ІІ (ДР 4.3.2) подають за допомогою насоса (Н-19) композицію І (ДР 4.3.1) зі збірника (Р-16) об'ємом 100 л.

Потім за допомогою стисненого повітря по трубі перетискування з інокулятора (І-15) перекачують посівний матеріал (від ТП 5.5). Включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в рубашку посівного апарату (ПА-21) подають пару.

Культивування здійснюють при температурі 37 °С впродовж 48 год за швидкості перемішування 300 об/хв. За необхідності, під час культивування регулюють рівень рН в межах 7,2-7,8 за допомогою титруючих агентів (NaOH чи HCl). Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. У пробі відібраній на 48 годину культивування, концентрація біомаси повинна перебувати в межах 5,8-6,0 г/л.

ТП 6. Біосинтез

У ферментер (ФР-29) об'ємом 6300 л з композицією II (ДР 4.4.2) подають за допомогою насосу (Н-27) зі збірника (Р-26) об'ємом 2 м³ композицію I (ДР 4.4.1) та зі збірника (Р-22) об'ємом 30 л подають за допомогою насосу (Н-23) композицію III (ДР 4.4.3). Далі з посівного апарату (ПА-21) перекачують 226,8 л посівного матеріалу (від ТП 5.6) у ферментер (ФР-29). Вмикають перемішування та аерацію, в рубашку ферментера подають пару.

Біосинтез здійснюють при температурі 37 °С впродовж 34 год. за швидкості перемішування 300 об/хв. За необхідності, під час культивування регулюють рівень рН в межах 7,2-7,8 за допомогою титруючих агентів (NaOH чи HCl).

У процесі культивування, кожні 4 год, відбирають проби для здійснення мікробіологічного контролю та контролю показників росту та синтезу, концентрація біомаси повинна перебувати в межах 11,8-12,0 г/л, а активність антибіотику має становити 910,4 од/мл.

ТП 7. Відділення біомаси

Культуральна рідина з ферментаційного процесу насосом передається в реактор (Р-33). З реактора (Р-33) відцентровим насосом (Н-34) культуральна рідина подається до центрифуги (Ц-35). Центрифугування відбувається упродовж 30 хвилин, у центрифугі (Ц-35) при частоті обертання 3000 об/хв. Біомаса подається на знешкодження відходів (ЗВ 5.1). Супернатант подається на наступні етапи виділення бацитрацину.

ТП 8. Виділення бацитрацину

ТП 8.1. Екстракція

Супернатант (від ТП 1) подається у реактор (Р-36), для зберігання. Далі розчин за допомогою насосу (Н-37) подається в екстрактор (Е-38), куди ж подається н-бутанол з реактора (Р-31). Водна фаза піддається повторній екстракції н-бутанолом. Водна фаза подається в реактор (Р-39), далі подається в екстрактор (Е-41), куди ж подається н-бутанол з реактора (Р-31).

Відбувається екстракція протягом 20 хв, при перемішуванні в 250 об/хв.

ТП 8.2. Концентрування та видалення бутанолу

Далі водну фазу подають у реактор (Р-42), звідти за допомогою насосу (Н-43) подають на упарювач (ВВА-44), де випарюють при тиску 0,002-0,005 МПа та температурі 30 °С протягом 45 хв. У процесі випарювання відбувається видалення органічних розчинників.

ТП 9. Сушіння

Суспензію (від ТП 2.2) подають у розпилюючу сушарку (С-47). Процес сушіння здійснюють за температури 120±5°С і триває процес 2,5 год. Відпрацьоване повітря йде на знешкодження відходів (ЗВ 5.3).

ПМВ 10. Фасування

Сухий антибіотик подаємо на стіл для ручного фасування антибіотику (Ст-48), де фасують у пластикові флакони, наносять відповідне маркування та відвантажують на склад.

ЗВ 10. Знешкодження відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 10.1. Знешкодження твердих відходів

Для знешкодження та утилізації твердих відходів використовують термічні методи їх обробки на сміттєспалювальних заводах та полігонах.

Спалювання помірно та мало небезпечних відходів можна здійснювати в печах різної конструкції (камерні, барабанні, із зваженим шаром та інші), але в кожній із них повинні існувати різні температурні зони.

ЗВ 10.2. Знешкодження рідких відходів

Знешкодження рідких відходів відбувається шляхом пропускання останніх через фільтри комплексної очистки. Відфільтрована вода скидається в каналізацію мережу.

ЗВ 10.3. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьовані гази подають на розділення методом

низькотемпературної ректифікації, для отримання аргону, який повторно залучається у процес.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

Даний тип контролю здійснюють після стерилізації композицій/поживних середовищ і під час етапів підготовки посівного матеріалу і власне біосинтезу.

Мікробіологічний контроль здійснюють розсівом культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій. Сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА) використовують для виявлення дріжджів та грибів [29]. Про стерильність простерилізованих поживних середовищ і композицій свідчить відсутність росту на тестових поживних середовищах.

Після процесу культивування у культуральній рідині необхідно спостерігати лише культуру продуцента. Характерними морфологічними ознаками продуцента є великі колонії пухирчастої форми, утворюють складочки після висихання, непрозорі, з віком тьмяніють і утворюють шорстку поверхню. Мають волосоподібні вирости («лихеніформні»), сильно прикріплені до агару, межі яких змінюються від хвилеподібних до фімбріат. Колір колоній білуватий і може стати коричневим з часом [14].

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препаратів «роздавлена крапля». Препарат готують на предметному склі, яке попередньо знежирюють. Після нанесення на скло маленької краплі культуральної рідини, його накривають накривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом 40x без імерсійної системи та 90x з імерсійною системою. Наявність інших клітин, які будуть відрізнятися за формою та розмірами, може свідчити про

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Олексюк Ю.М.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					61	19
Консультант		Клименко О.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

наявність сторонньої мікробіоти.

Характерні культуральні ознаки *Bacillus licheniformis* – паличкоподібна (рис. 7.1), грампозитивна бактерія, здатна утворювати спори [13]. Розміри клітин 0,6–0,8×1,5–3,0 мкм. Спори зазвичай еліпсоїдної або циліндричної форми, можуть розміщуватися центрально, парацентрально чи субтермінально [14].

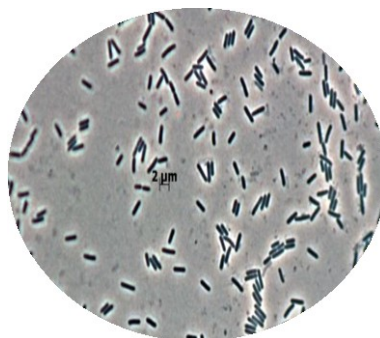


Рис. 7.1. Клітини *Bacillus licheniformis* [14]

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають за допомогою вагового методу.

Перш за все необхідно відділити залишки жмиху, це можна здійснити за допомогою сепарування. Далі маніпуляції проводяться з фазою, що містить клітини продуцента.

Визначення біомаси продуцента складається з трьох послідовних етапів: доведення маси центрифужних пробірок до постійного значення, відділення клітин від культуральної рідини, визначення їх маси.

Доведення маси центрифужних пробірок до постійного значення. З цією метою центрифужні пробірки поміщують в сушильну шафу і висушують протягом 1–2 год при температурі 90–100°C. Потім центрифужні пробірки виймають з сушильної шафи і переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких проводитиметься зважування. За

годину центрифужні пробірки зважують з точністю до 0,0001 г. Висушування і зважування повторюють, дотримуючи вказану послідовність операцій, поки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її визначеннях не перевищать $\pm 0,0001$ г.

Відділення мікроорганізмів від середовища здійснюють за допомогою центрифугування. Для цього в центрифужну пробірку наливають точно зміряний об'єм ретельно перемішаної рідкої культури, котрий в залежності від її густини коливається від 5 до 20 мл. Час центрифугування і число обертів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно оборотів і тим продовжуючи повинен бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15–20 хв при 5–10 тис. обертів в хв. Після центрифугування рідину обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знов центрифугують при тому ж числі обертів. Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги. Інакше частина осаду може бути втрачена.

Щоб визначити масу сухих клітин продуцента, центрифужну пробірку з осадом клітин мікроорганізмів поміщають в сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування і зважування такий, який використовували і при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = \frac{(A - B)1000}{V}$$

де M – суха біомаса в г/л; A – маса центрифужної пробірки з осадом в г; B – маса центрифужної пробірки без осаду в г; V – об'єм культуральної рідини, взятий для центрифугування в мл. Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища і ретельністю зважування [44].

7.2.2. Концентрація цільового продукту

Культуральну рідину центрифугують при 5000 g впродовж 20 хв.

Супернатант змішують з 4^{ма} об'ємами 50% етанолу, суміш струшують 5 хв потім центрифугували при швидкості 9168 g 5 хв. Далі суміш фільтрують через шприцевий фільтр (склад фільтру – змішані естери целюлози, розмір – 0,22 мкм). Одержаний фільтрат аналізують за допомогою ВЕРХ з колонкою Eclipse Plus C18 (4.6 мм × 150 мм, 3.5 мкм) за наступних умов: рухома фаза, А (0,05 Моль/л K₂HPO₄ та 0,05 Моль/л KH₂PO₄); В (13:1 (об'ємна частка) метанол-ацетонітрил), співвідношення складових 35/65 (об'ємна частка); швидкість потоку 1,0 мл/хв; детекція – УФ спектр 254 нм; ін'єкційний об'єм проби – 20 мл; температура – 30 °С [6].

Обладнання для проведення аналізу:



Рис. 7.2. Хроматограф Agilent 1260 Infinity LC

ВЕРХ Agilent 1260 Infinity LC- модульний хроматограф для високоефективної рідкої хроматографії, являється еволюційним продовженням популярних модель Agilent 1100 і 1200. Модульна система якого дозволяє вирішити на хроматографі практично будь яку аналітичну задачу [45].

Особливості хроматографа **Agilent 1260 Infinity LC**:

- ▶ в хроматограф вбудована система діагностики течій;
- ▶ з'єднання всіх блоків за допомогою LAN-інтерфейсів;
- ▶ унікальна система РЧ- ідентифікації колонок, ламп, проточних кювет і кранів;
- ▶ зручний фронтальний доступ до всіх ключових вузлів хроматографа,

що вимагають періодичної заміни (лампи, кювети, крани та ін.);

▶ хороша ремонтпридатність: відсутність кріпильних шурупів і болтів для монтажу електронних плат;

▶ добре зарекомендували себе системи самодіагностики і система оповіщень про необхідність проведення профілактичних робіт (EMF) [46].

Технічні характеристики **Agilent 1260 Infinity LC**:

1. Стандартний дегазатор – 4 канала, швидкість потоку до 10 мл/хв, внутрішній об'єм на один канал 12 мл.;

2. Високоєфективний дегазатор – 4 канала, швидкість потоку до 10 мл/хв, внутрішній об'єм на один канал 0,45 мл.;

3. Двухканальний градієнтний насос – тиск до 600 бар при швидкості потоку до 5 мл змішування двох компонентів;

4. Чотирьохканальний насос – тиск до 600 бар при швидкості потоку до 5 мл, тиск до 200 бар при швидкості потоку до 10 мл, змішування чотирьох компонентів;

5. Чотирьохканальний біоінертний насос – аналогічно звичайному чотирьох канальному насосу;

6. Пристрій ручного введення проби – зміні петлі від 5 мкл до 20 мл.

7. Пристрій ручного введення проби біоінертне - зміщення петлі від 5 мкл до 20 мл;

8. Стандартний пристрій введення проби – об'єм введеної проби від 0,1 до 100 мкл, може бути розширена до 1500 мкл, введення проби тільки із віал;

9. Високоєфективний пристрій введення проби – об'єм введеної проби від 0,1 до 100 мкл, може бути розширене до 1500 мкл, введення проби із віал і мікропланшета;

10. Термостат колонок - вміщується 3 колонки довжиною 30 см, температурний діапазон до 80°C;

11. Однохвильовий УФ детектор із зміною довжиною хвилі – діапазон довжин хвиль від 190 до 600 нм, шум $\pm 2,5 \mu\text{AU}$, частота сигналу 80 Гц, можливе детектування тільки на одній довжині хвилі;

12. Багатохвильовий УФ детектор із зміною довжиною хвилі – Діапазон довжин хвилі від 190 до 950 нм, шум $\pm 7\mu\text{AU}$, частота сигналу 80 Гц, можливе детектування до 8 довжин хвиль одночасно [45].

13. Детектор з діодним матрицею – діапазон довжин хвиль від 190 до 640 нм, шум $\pm 0,6\mu\text{AU}/\text{cm}$ при використанні 60 мм «Max-Light» осередки або $\pm 3\mu\text{AU}/\text{cm}$ при використанні 10мм «Max-Light» осередки частота сигналу 80 Гц до 8 довжин хвиль одночасно або зняття повного спектра.

7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Зі складу поживного середовища, бачимо, що основними джерелами вуглецю і азоту є: соєвий та рапсовий жмих, крохмаль та амоній сульфат. Проаналізувавши склад соєвого та рапсового жмиху, можемо зробити висновок, що:

- 1) соєвий жмих є, в основному, джерелом вільних амінокислот, так як вони складають до 45% сухої маси жмиху [46];
- 2) рапсовий жмих з низьким вмістом білку є, в основному, джерелом вуглецю. Адже у своєму складі містить до 45% різних джерел вуглецю (крохмаль, глюкоза, сахароза і т.д.) [47].

Тому і надалі будемо спиратися на даний склад компонентів.

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю виступає рапсовий жмих і крохмаль. Для цього підійде метод редукуючих цукрів.

Концентрацію редукуючих цукрів визначають у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини (5000 об/хв, 20 хв).

В основі методу лежить визначення кількості редукуючих вуглеводів за допомогою колориметричної реакції цукрів з 3,5-динітросаліциловою кислотою. Реакція вуглеводів з цією кислотою протікає в лужному середовищі при нагріванні в киплячій водяній бані. Динітросаліцилова кислота перетворюється цукрами в 3-аміно-5-нітросаліцилову кислоту, яка має яскравий жовто-оранжевий колір, інтенсивність забарвлення якої визначають на спектрофотометрі.

Після центрифугування культуральної рідини, 0,25 мл зразка надосадової рідини змішують з 1 мл реагенту ДНС (0,25 г 3,5-динітросаліцилової кислоти, 50 мл 2 н NaOH, 75 г солі Rochelle, в 250 мл води), суміш кип'яють при 100 °С протягом 5 хв і охолоджують водопровідною водою. Кінцевий розчин зразка отримують шляхом розбавлення 4 мл дистильованої води. Кількісне визначення редуруючих цукрів проводять шляхом вимірювання оптичної густини зразка на спектрофотометрі з довжиною хвилі 570 нм [48].

Визначення концентрації джерела азоту

В якості джерела азоту в середовищі виступає амоній сульфат та вільні амінокислоти, що містяться у соєвому та рапсовому жмиху.

Фотометричний метод визначення амонійного азоту.

Принцип методу. Метод базується на кількісному визначенні нітрогену, що міститься в добривах у вигляді солей NH_4^+ . Для цього часто використовують кольорову реакцію з реактивом Неслера. Реактив Неслера з йонами NH_4^+ утворює важкорозчинну червоно-оранжеву комплексну сполуку.

Методика аналізу. У мірну колбу об'ємом 25 мл вносять пробу супернатанту, доливають 1 мл 50%-ного розчину калію-натрію тартрату і 1 мл реактиву Неслера, перемішують. Через 10 хвилин реєструють значення оптичної густини розчинів у кюветах з товщиною оптичного шару 1 см з фіолетовим світлофільтром ($\lambda = 440$ нм) відносно води, яка не містить амоніаку, у яку додані відповідні реактиви. Забарвлення розчину є стійким протягом 1 години. Вміст іонів амонію (мг) знаходять за градувальним графіком.

Побудова градувального графіку

У ряд мірних колб об'ємом 25 мл вносять: 0 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 6,0 – 8,0 – 10,0 – 12,0 мл робочого розчину амонію хлориду. Доводять об'єм водою, яка не містить амоніаку, до мітки і додають реактиви, як і при аналізі проби. Фіксують значення оптичної густини через 10 хвилин після додавання

реактиву Неслера. Градувальний графік будують у координатах оптична густина (А) – концентрація іонів амонію ($C(NH_4^+)$, мг/мл).

Вміст іонів амонію (Q_x , мг) розраховують за формулою:

$$Q_x = C_x \times V_{\text{проби}}$$

де C_x – концентрація іонів амонію у пробі, знайдена за допомогою градувального графіку, мг/мл; Q_x – вміст іонів амонію, мг; $V_{\text{проби}}$ – об'єм проби, узяті для аналізу, мл. [49].

Для визначення азоту амінокислот (у соєвому та рапсовому жмиху) використовуємо метод формольного титрування (або титрування по Серенсену). Метод базується на взаємодії аміногруп білків з формаліном. Під час реакції з формаліном аміногрупа втрачає свої основні властивості, а утворювана метиламінокислота відтитровується 0,1 н розчином луку гідроксиду натрію. За кількістю витраченого на титрування луку визначають кількість $COOH$ -груп. В середньому число карбоксильних груп в амінокислотах приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для моноамінокислот, для діамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Методика визначення азоту амінокислот. До 1 мл супернатанту культуральної рідини (відділення за допомогою центрифугування) додають 9 мл води (рН розчину має становити 7,0). При необхідності розчин нейтралізують шляхом додавання 0,1 М розчину гідроксиду натрію або 0,1 М розчину хлоридної кислоти. Після закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду, перемішують і титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно проводять контрольний дослід (паралельно титрують дистильовану воду). 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту [50].

7.3. Показники якості готового продукту

7.3.1. Ідентифікація бацитрацину

Силікагель готували з дистильованою водою у співвідношенні 1: 2 і негайно переносили на предметне скло рівномірно розподіляючи, сушили на повітрі і витримували в духовці при 105 °С протягом 30 хв. Розчинник для рухомої фази – бутанол: вода (8:2). Контрольну лінію проводили на пластині з силікагелем на відстані 1,5 см від нижнього кінця. На краю позначили плями, а досліджувані зразки наносили на плями (10-20 мкл), пластинку з силікагелем суспендували в розчиннику. Пластину виймали, коли міграція розчинника становила майже 80% довжини пластини. Оцінка була проведена шляхом порівняння коефіцієнта відставання бацитрацину із стандартним коефіцієнтом відставання бацитрацину.

Коефіцієнт відставання (R_f) = відстань, пройдена розчинником / відстань, пройдена розчиненою речовиною [34].

7.3.2. Антимікробна дія

Планшети з агаром Мюллера-Хінтона (МНА) готували з використанням 20 мл середовища і залишали на ніч при кімнатній температурі для перевірки наявності будь-яких забруднень/контамінацій в планшетах. Тест-культури (*Staphylococcus aureus* та *Micrococcus luteus*) вирощували в живильному бульйоні і розбавляли ($OD_{620\text{ nm}} = 0,1$) для отримання бактеріальної суспензії 1×10^8 КУО / мл перед нанесенням на чашку з агаром. Лунки з агаром діаметром 5 мм готували з використанням стерилізованого сталевого гелевого перфоратора, і в кожен лунку вводили 200 мкл екстрактів з культурами. У лунку додавали 50 мкл бацитрацину. Планшети інкубували протягом 24 годин при 37°C. Після інкубації спостерігали зону гальмування (в мм) [34, 51].

7.3.3. Вологість кінцевого продукту

Контроль вологості готового продукту проводять за допомогою аналізатора вологості Radwag MA 50/C/P – це сучасний лабораторний електронний вимірювальний прилад виробництва фірми Radwag (Польща), призначений для визначення маси та відносної вологості або сухого залишку у будь-яких сипких і рідких продуктах.

За допомогою даного аналізатора вологості необхідні вимірювання провести набагато простіше і швидше – всього за 5-20 хвилин.

У конструкції аналізатора вологості моделі Radwag MA 50/C/P закладена можливість для підключення персонального комп'ютера, принтера КАФКА і клавіатури, а це, спрощує введення параметрів сушіння.

Бібліотека програми дозволяє користувачеві запрограмувати в прилад до 99-ти власних унікальних умов сушіння. Для роботи системи необхідно буде тільки обрати назву потрібного продукту, а не вводити кожен раз усі параметри сушки. У бібліотеці пам'яті аналізатора зберігаються дані про останні 99 виміри. Ці дані включають дату і час вимірювання, назва продукту, час сушіння, стартову та кінцеву масу, температуру і профіль сушки та результат (вміст вологи).

Загалом, аналізатор вологості Radwag MA 50/C/P – це зручний, практичний і сучасний прилад, який робить процес визначення вологості швидким і нескладним [52].

7.4. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю біосинтезу бацитрацину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.2 Підготовка робочого розчину кальцинованої соди	Концентрація розчину кальцинованої соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 2 \%$
Кт 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	$t = 50-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60 \text{ хв}$, чисте обладнання
Кт 1.3.3. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, температура, тиск, час, перепад тиску	Манометр технічний, термометр, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,1-0,2 \text{ МПа}$, $\tau = 30-60 \text{ хв}$, $\Delta P < 0,01 \text{ Мпа}$

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт 1.3.4. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час стерилізації, надлишковий тиск визначають після проведення стерилізації	$t = 130-135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 1 \text{ год}$, $P = 0,003-0,005 \text{ МПа}$
Кт 2.2. Попереднє грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 75 \%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,4 \text{ МПа}$, $t = 220-250 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, після видалення зайвої вологи температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	$t = 25-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $W = 60 \%$

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт 2.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6. Головне тонке очищення повітря	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 95\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	$E = 99,999 \%$, тиск згідно паспорту
Кх 3.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	$C = 6 \%$

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлужнення поживного середовища	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину гідроксиду натрію	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти, $C = 6\%$
Кт, Км 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура і час, стерилізації	Манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти,

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура і час, стерилізації	Манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти,
Кт, Км 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура і час, стерилізації	Манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти,
Кт, Км 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура і час, стерилізації	Манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти,

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.4.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура і час, стерилізації	Манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти,
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Культура <i>B.</i> <i>licheniformis</i> DW2, тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічний контроль після збереження	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3\text{ міс}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Робоча культура <i>B.</i> <i>licheniformis</i> DW2, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі	Робоча культура <i>B. licheniformis</i> DW2, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів перемішуючого пристрою контролюються перед культивуванням, мікробіологічний контроль і визначення концентрації біомаси проводиться після вирощування	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 250$ об/хв, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л	Посівний матеріал, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	рН визначається перед культивуванням, температура визначається безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 години	рН = 7,2-7,8, t = 37 °С, n = 300 об/хв, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти, X = 5,8-6,0 г/л
Кх, Кт, Км 5.6. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л	Посівний матеріал, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	рН визначається перед культивуванням, температура визначається безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 години	рН = 7,2-7,8, t = 37 °С, n = 300 об/хв, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти, X = 5,8-6,0 г/л

Закінчення табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 6. Біосинтез	Культуральна рідина, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси і антибіотику	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль, ваговий метод та ВЕРХ	рН визначається перед культивуванням, температура визначається безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси та активності антибіотику відбираються кожні 4 години	рН = 7,2-7,8, t = 37 °С, n = 300 об/хв, τ = 34 год, відсутність сторонньої мікробіоти, X = 11,8-12,0 г/л 910,4 од/мл

РОЗДІЛ 8. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Загальна схема сушіння антибіотику бацитрацину зображена на рисунку 8.1.

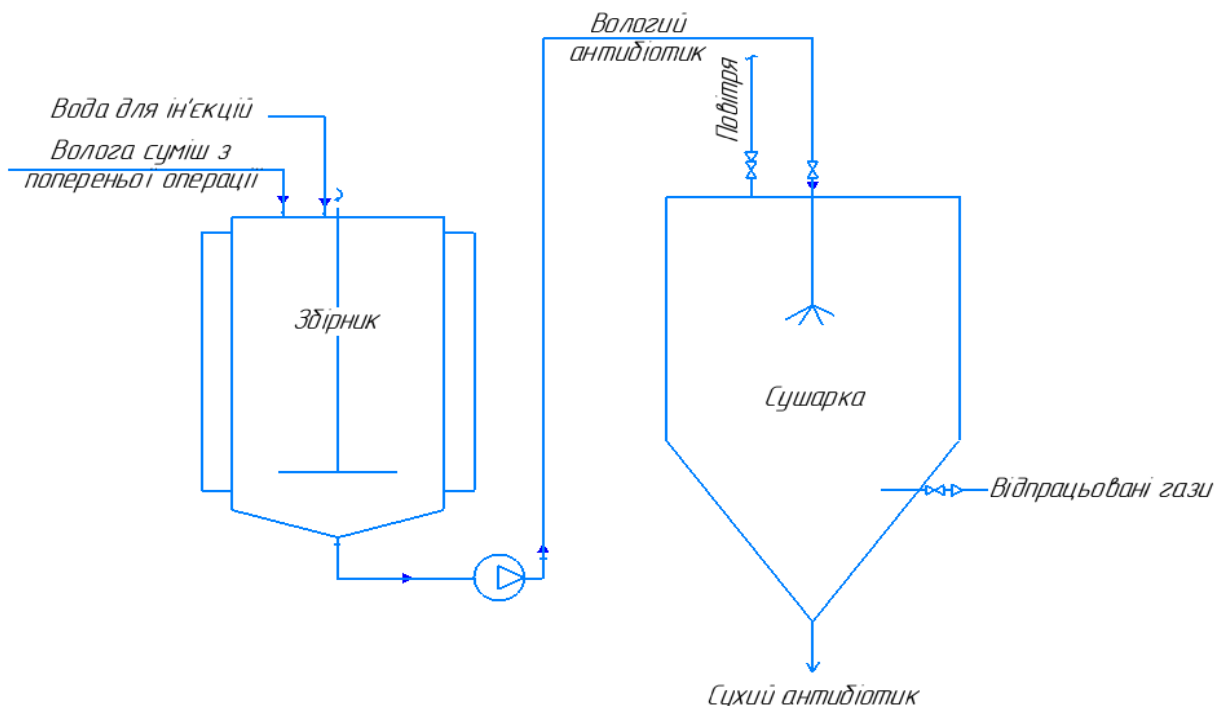


Рис. 8.1. Машинно-апаратна схема етапу сушіння бацитрацину

Антибіотик після попередніх етапів очищення подається у збірник, де зволожується водою для ін'єкцій (для полегшення подачі на сушарку). У збірнику контролюємо рівень суспензії та температуру розчину до етапу сушіння. Далі за допомогою насоса (вкл/вкл) відбувається безпосередня подача бацитрацину у розпилюючу сушарку. На етапі сушіння контролюється температура процесу (шляхом подачі теплого повітря) та кінцева вологість продукту.

Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати рівень рідини у збірнику з сигналізацією досягнення верхнього

Верхнього					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Олексюк Ю.М.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Сулейко Т.Л.					80	4
Консультант	Клименко О.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						
РОЗДІЛ 8. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА							

припустимого рівня і управління клапаном подачі рідини у збірник (1в). У схемі буде використаний тільки один електрод, який встановлюється в точці яка відповідає верхньому припустимому рівню. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М1 відбувається подача розчину в сушарку.

У третьому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати температуру розчину перед подачею його у наступні технологічні апарати, яка має регламентоване значення 40°C . Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок вмикання чи вимикання подачі води у рубашку апарату (2в).

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління, в сушильній шафі необхідно контролювати і регулювати температуру, яка має регламентоване значення $120 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі гарячого повітря.

У п'ятому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати вологість продукту, щоб знати коли закінчити процес. Вологість кінцевого продукту має регламентоване значення 5%. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві.

Таблиця 8.1.

Завдання на розробку системи автоматизації

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Збірник	Рівень суміші в збірнику	65% ± 3%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
2	Насос подачі рідини з збірника в сушарку	Стан насосу подачі рідини з збірника в сушарку	Вімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМ оператора і кнопка «Стоп» по місцю
3	Сушарка	Температура матеріалу до сушарки	40°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вмикання/вимикання нагріваючого пристрою
4	Сушарка	Температура в апараті	120±5°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вмикання/вимикання нагріваючого пристрою
5	Сушарка	Вологість антибіотику після процесу сушіння	5 %	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

Специфікація засобів автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1a	Рівень	В агрегаті	Контактний датчик рівня, з вихідним сигналом по напрузі	SITRNS L Pointek CLS 200	ДП «Сименс Україна» м.Київ
2a 3a	Температура	В агрегаті	Датчик термомперетворювач опору діапазон (-40 ...+180)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	TCM-100	ООО "ФІРМА КОНТРАГЕН Т, Україна
1б 2б 3б	Температура Рівень	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
1в 2в 3в	Температура Рівень	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20...100 кПа, крутячий момент – 5...30 нм/бар, кут повороту – 90°	KUP	Kobold
4a	Вологість	По місцю	Ємнісний датчик відносної вологості, діапазон вимірювань 0...100%, клас точності 2, показник інерції 2хв	ДВ УТ-02-НІН	ПАО „Тера”, Україна
КМ1	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В	3RT2015 -1AP01	SIEMENS
SA1	Перемикач	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210 -2DA11	SIEMENS
SB1 SB2	Перемикач	На щиті	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Для розуміння і обрахунку відходів виробництва нижче подано узагальнюючу таблицю (див. табл. 9.1):

Таблиця 9.1.

Етапи утворення відходів виробництва

Етап виробництва	Тип утворених відходів	Примітки
1	2	3
Санітарна підготовка виробництва	Рідкі відходи	Відпрацьовані розчини після щоденного, генерального прибирання та миття обладнання потребують утилізації
Приготування та стерилізація титрувальних агентів	-	Титруючі агенти задіяні в процесі біосинтезу. Процес утилізації необхідний лише у випадку трапової стерилізації розчину натрій гідроксиду (не проходження мікробконтролю). Тому на даному етапі вважатимемо, що відходів не утворюється.
Приготування та стерилізація поживних середовищ	Тверді відходи	Процес утилізації необхідний лише у випадку трапової стерилізації (не проходження мікробконтролю). Потребують утилізації пакувальні матеріали та тара компонентів ПС
Підготовка посівного матеріалу	Газоподібні відходи	Процес утилізації необхідний лише у випадку порушення асептичності (наявність сторонньої мікробіоти). Продуценту для росту необхідне стерильне повітря – як результат отримуємо відпрацьоване повітря
Біосинтез	Тверді відходи та газоподібні відходи	Процес утилізації необхідний лише у випадку порушення асептичності (наявність сторонньої мікробіоти). Цільовий продукт – екзогенний, тому біомасу необхідно знешкодити і утилізувати (адже нас цікавить КР). Продуценту для росту і біосинтезу необхідне стерильне повітря – як результат отримуємо відпрацьоване повітря

НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Олексюк Ю.М.							
Перевір.	Сулейко Т.Л.						84	10
Реценз.						87		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Пирог Т.П.							

1	2	3
Екстракція	Рідкі відходи	При процесі екстракції утворюються 2 рідкі фази з різною розчинністю, так як для наступних етапів нам необхідна лише фаза, що містить розчинений антибіотик, інша – йде на знешкодження і утилізацію.
Сушіння	Газоподібні відходи	Для процесу необхідний газ-носіє – повітря – як результат після даного етапу отримаємо відпрацьованого повітря

Характеристика та оцінка рідких відходів\

Після оцінки місця утворення різних відходів необхідно оцінити кількість останніх. Почнемо з рідких відходів.

Миття обладнання. Для миття наших апаратів: ферментер (6,3 м³), збірники для композицій для приготування середовища для біосинтезу (4 м³, 200 л та 30 л), посівний апарат (400 л), збірники для приготування середовища для вирощування інокуляту (160 л та 100 л), інокулятора (20 л), збірників для приготування композицій (6 л та 8 л) та збірників для приготування титруючих агентів (20 л), враховуючи що миття апаратів відбуватиметься за допомогою СІР-мийки і об'єм мийного засобу складатиме близько 20 % кожного з відповідних об'ємів обладнання, матимемо:

$$(6300+4000+200+30+400+160+100+20+6+8+20+20) \times 0,2=2253 \text{ л}$$

робочого розчину мийного засобу,

а для всього періоду виробництва – $2253 \times 164 \text{ цикли} = 369492 \text{ л}$.

Підготовка приміщень. Для одного виробничого циклу (44 год – це приблизно 2 доби) для прибирання необхідно приблизно 25 л мийно-дезінфікувального засобу, а на рік ця цифра становить приблизно 4450 л засобу, який необхідно утилізувати.

Екстракція за допомогою розчину бутанол-ефіру та подальша екстракція з ефіром без пероксиду. На першому етапі екстракції додається рівний об'єм бутанол-ефіру. Будемо вважати, що після кожної екстракції ми зливаємо 1/3 об'єму для наступного етапу, 2/3 – це відходи. Приблизний об'єм рідких

відходів на даному етапі становить 5 м³ рафінату.

Фільтрування та промивання. Зазвичай для промивання необхідно 1,5-2 рази більше розчину, аніж цільового продукту (вказані дані умовні), тому на даному етапі утворюється 3 м³ відпрацьованого розчину за цикл.

Характеристика та оцінка твердих відходів, утворених при виробництві бацитрацину

Тверді відходи утворюються на етапі підготовки поживних середовищ – це упаковка/тара від компонентів композицій. На даному етапі нас цікавить не скільки кількість утворених відходів, а їх тип – для більш раціональної утилізації.

Паперові, металеві та скляні відходи можна здавати у пункти прийому вторинної сировини (попередньо очистивши упаковку від вмісту). Паперові упаковки (без додавання пластику) також можна використовувати у процес компостування.

Пластикові відходи необхідно здавати у спеціалізовані пункти прийому пластикової сировини. Також, як варіант, можна надавати у лабораторії по вирощуванню бактерій здатних до розкладання пластику.

Біосинтез. Так як цільовий продукт антибіотик – екзогенного походження, то нас цікавить лише культуральна рідина. На даному етапі твердими відходами є біомаса. Розрахуємо, скільки біомаси утворюється по завершенню виробничого біосинтезу: 12 г/л біомаси × 3700 л КР за цикл = 44400 г або 44,4 кг. Враховуючи, що за рік відбувається 164 цикли, то загальна кількість відходів становить: 44,4×164=7281,6 кг.

Характеристика та оцінка газоподібних відходів, утворених при виробництві бацитрацину

Підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез. Тривалість вказаних етапів складає 48 год та 34 год, відповідно. Для забезпечення умов аерації використовуємо стиснене стерильне повітря зі швидкість 1 л/хв. Враховуючи, що підготовка посівного матеріалу відбувається у 2х апаратах маємо:

$$2 \times (60 \times 48) + 1 \times (60 \times 34) = 7800 \text{ л} = 7,8 \text{ м}^3.$$

Таблиця 9.2

Відходи при виробництві бацитрацину

Етап виробництва, який є місцем утворення відходів	Складові відходів	Приблизні об'єми за виробничий цикл	Клас небезпеки
Миття та ополіскування обладнання	Кальцинована сода, бруд	2253 л (369492 л за рік)	3 клас
Щоденне прибирання виробничих приміщень Генеральне прибирання виробничих приміщень	0,2% робочий розчин «Хлорантоїну» Дихлорантин, 5,5-диметилгідантоїн, натрій триполіфосфат, аніонні поверхнево-активні речовини, натрій бензоат, наповнювач 0,2% робочий розчин ДЕЗЕКОНу Комплекс четвертинних амонієвих сполук, алкілдиметилбензиламоній хлорид, октилдецилдиметиламоній хлорид, дидецилдиметиламоній хлорид, діоктилдиметиламоній хлорид	25 л (4450 л за рік)	3 клас
Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 400 л Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м ³	Відпрацьоване повітря (CO ₂), пил	7,8 м ³	4 клас
Отримання супернатанту культуральної рідини центрифугуванням	Відділена біомаса – клітини продуцента	44,4 кг за цикл (7281,6 кг за рік)	4 клас
Екстракція за допомогою н-бутанолу	Рафінат – водна фаза, яка не містить цільовий продукт	5 м ³ за цикл	3 клас
Сушіння	Відпрацьоване повітря	-	3 клас

9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Зменшення об'єму газоподібних відходів

Газоподібними відходами на даному виробництві є вуглекислий газ, водяна пара та пил. Тому за для зменшення об'єму газів доцільно буде використати метод компримування.

Компримування здійснюється в один або декілька ступенів, тип і потужність компресора визначається залежно від кількості компримованого газу і необхідного ступеня підвищення тиску (ступеня стиснення). Компримування супроводжується підвищенням температури газу і, як правило, потребує його подальшого охолодження. [53] Для компримування газів застосовують ГПА (газоперекачувальні агрегати).

Утилізація газів

Пристрої для біохімічного очищення газів діляться на дві групи: біологічні фільтри і біоскрубери.

Біологічний метод очищення може бути реалізований в апаратах або пристроях трьох типів:

- у фільтрах з шаром зволоженого ґрунту або компосту, через який пропускається очищається газ при навантаженні до 100 мг / (кг · год);
- в біофільтрах з інертною насадкою, на поверхні якої штучно вирощується біоплівка активного мулу (суспензія, що містить 5 ... 10 г / л активного мулу);
- в апаратах барботажного типу (скрубберах) з водною суспензією мікродоростей хлорели або активного мулу.

Екологічна досконалість очищення газових викидів визначається відношенням досягається рівня знешкодження та екологічно прийняттого рівня забруднення біосфери.

Біоскрубер працює як реактор із насадкою і протитоком рідини часто це стічні води. Витрати води такі, що на поверхні насадки утворюється біоплівка, але її ріст є суворо обмеженим для запобігання надмірного замулювання споруди. Забруднювальні компоненти викиду переносяться із

повітря в рідину, після чого окиснюються мікрофлорою біоплівки.

Принцип функціонування біоскуберів відрізняється тим, що процес очищення повітря реалізовується у двох різних установках. На першому етапі токсичні речовини, що знаходяться у повітрі, а також кисень, розчиняються у воді. У результаті повітря виходить очищеним, а забруднена вода іде далі на очищення. У біоскруберах витягнені із газів компоненти розкладаються при контактуванні їх з суспензією активного мулу, для чого можна використовувати скрубери найрізноманітнішої конструкції [54].

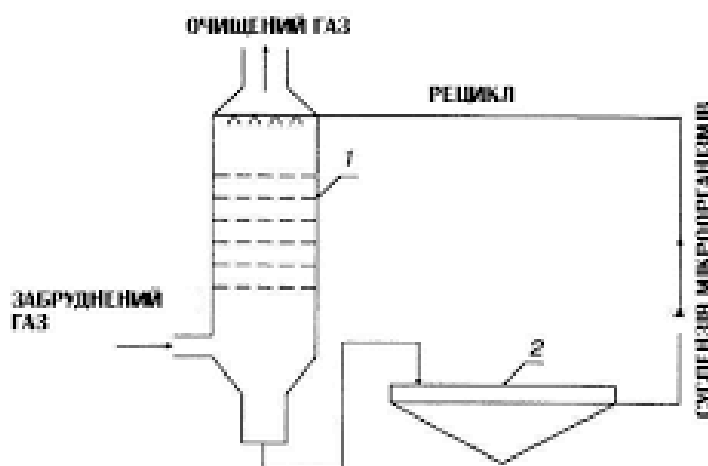


Рис. 9.1. Схема роботи типового біологічного скрубера

Зменшення об'єму рідких відходів:

- мінімізація використання води;
- повторне використання або переробка рідких відходів на місці.

Промислові мули та стічні води складають значну частину потоків виробничих відходів. Ви можете зменшити ці витрати, мінімізуючи використання води в операціях. Цього можна досягти за допомогою хімічних сушильних агентів, зворотного осмосу, сухої обробки або мембранного біологічного реактора [55].

Утилізація рідких відходів

ФітореMediaційні технології очищення стічних вод, засновані на використанні рослин в співтоваристві з мікроорганізмами, представляють в екологічному плані ефективне доповнення, а в деяких випадках —

альтернативу традиційним технологіям.

Фіторемедіація від грецького "фітон" (рослина) і латинського "ремедіум" (відновлювати) - комплекс методів очищення стічних вод, ґрунтів і атмосферного повітря з використанням зелених рослин.

Біоплато – на водосховищах і каналах. Внаслідок просторості займаної території, невеликої товщини наземного водного шару в цих системах створюються умови для досить хорошого обміну верхнього шару забрудненої води з атмосферою, його аерації. У глибинних шарах можуть протікати аноксигенний і анаеробні процеси трансформації забруднень. Невисока швидкість течії води і тривалий час утримання забруднених вод сприяють осадженню суспензій, а високий вміст органічної речовини в ґрунті майданчиків - сорбції та зв'язуванню забруднень.

При створенні штучних гідроботанічні майданчиків використовують вільно плаваючі, підводні і надводні рослини (рис.9.2).

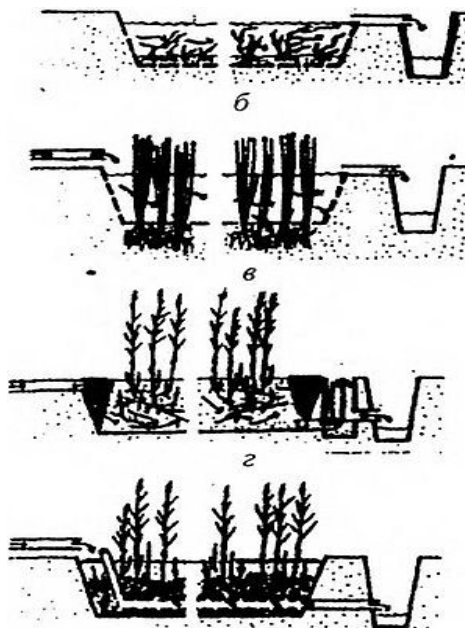


Рис. 9.2. Варіанти очищення забруднених стічних вод на гідроботанічні майданчиках:

а - вільно плаваючі рослини; б - підводні рослини; в - надводні рослини поверхневим потоком; г - надводні рослини з горизонтальним підповерхневим потоком; д - надводні рослини з вертикальним потоком

Штучні майданчика з розподілом забрудненої води по поверхні –

неглибокі штучні обводнені ділянки, що споруджуються з невеликим ухилом в низових ділянках з системою розподілу і контролю рівня води. Системи з розподілом води в підповерхневої зоні включають неглибокі майданчики, заповнені добре дренируемой матеріалом, наприклад гравієм, на які висаджують болотні рослини. Вода в таких системах тече під поверхнею через кореневу систему рослин.

Переробка твердих відходів

Твердими відходами даного виробництва є використана біомаса *Bacillus licheniformis*. Як частина циркулярної економіки, ресурси біомаси слід використовувати повторним використанням (одна і та ж мета / застосування), переробкою (перепрофілюванням для подальшого використання, як правило, у застосуванні подібної вартості або нижче) або переробленням / валоризацією (переорієнтацією на застосування) вищої вартості, наприклад, видобуток біопалива та біохімічних сировинних ресурсів як частина концепції біопереробки) [56].

Підводячи підсумки вищесказаного необхідно відзначити наступне, що виробництво антибіотика бацитрацину має відносно невеликі об'єми відходів. Проте задля екологізації та зменшення витрат на виробництво можна застосувати наступні способи:

- застосовувати метод компримування для зменшення об'єму газоподібних відходів;
 - застосування біофільтрів та біоскруберів для очищення відпрацьованого повітря;
 - мінімізувати використання води при виробництві та за можливості його повторне використання;
 - застосування фітореMediaції для очищення стічних вод;
- повторне використання біомаси продуцента

ЛІТЕРАТУРА

1. Лобова О.В. Конспект лекцій «Сільськогосподарська біотехнологія» / Лобова О.В., Пилипчук О.О. ; – Київ, 2014. – 83 с.
2. Sietske de Boer, F. Priest, B. Diderichsen On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Appl. Microbiol. Biot.*, 1994, 40(5): 595–598.
3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prodobavki.com/dobavki/E700.html>
4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.smithsonianmag.com/science-nature/one-girl-mishap-creation-antibiotic-bacitracin-180963236/>
5. Diarra M. S., Silversides F. G., Diarrassouba F., Pritchard J., Masson L., Brousseau R., Bonnet C., Delaquis P., Bach S., Skura B.J., Topp, E. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73(20): 6566-6576.
6. Wang Q, Zheng H, Wan X, Huang H, Li J, Nomura CT, Wang C, Chen S. Optimization of Inexpensive Agricultural By-Products as Raw Materials for Bacitracin Production in *Bacillus licheniformis* DW2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017;183(4):1146-1157. doi: 10.1007/s12010-017-2489-1
7. Edward H. Burt, Max R. Schroeder, Lauren A. Smith, Jenna E. Sroka, Kevin J. McGraw. Colourful parrot feathers resist bacterial degradation, *Biology Letters*, The Royal Society, 2010: doi:10.1098/rsbl.2010.0716.
8. Salkinoja-Salonen S., Vuorio R., Andersson M.A., Kämpfer P., Andersson M.C., Honkanen-Buzalski T., and Scoging A.C. Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(10): 4637–4645.

9. Pepe O., Blaiotta G., Moschetti G., Greco T., Villani F. Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003 Apr;69(4):2321–9.
10. A. Tahir, H. H. Roohi, T. A. Mughal. Biosynthesis of Zn bacitracin by *Bacillus licheniformis* under submerged fermentation using wheat bran. *J. App. Pharm.*, 2012, 4(1):26–37.
11. Bacitracin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stylab.ru/directory/antimicrobials/RIDASCREEN-Bacitracin/>.
12. Yu W, Li D, Jia S, Liu Z, Nomura CT, Li J, Chen S, Wang Q. Systematic metabolic pathway modification to boost L-ornithine supply for bacitracin production in *Bacillus licheniformis* DW2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019.103(20):8383-8392. doi: 10.1007/s00253-019-10107-7.
13. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7(4):204–211.
14. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=398>.
15. Коцюмбас І. Я., Гунчак В. М., Стецько Т. І. Проблеми використання антимікробних препаратів для стимулювання росту продуктивних тварин та альтернативи їх застосуванню // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2013. – Вип. 14, № 3-4. – С. 381-389.
16. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://www.thepigsite.com/articles/bacitracin-natural-peptide-with-minimal-resistance-issues>
17. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <http://vetvrach.info/antibiotiki16.html>

18. Электронный ресурс // [Режим доступа]: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed_additives_rules_scan-old_report_antibiotics-50.pdf
19. OIE LIST OF ANTIMICROBIALS OF VETERINARY IMPORTANCE
Электронный ресурс // [Режим доступа]: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Specific_Issues/docs/pdf/OIE_list_antimicrobials.pdf
20. Электронный ресурс // [Режим доступа]: <https://feedlife.com.ua/info/skolko-korma-nuzhno-svine/>
21. Электронный ресурс // [Режим доступа]: <http://webmvc.com/vet/leki/6/bacili.php>
22. Электронный ресурс // [Режим доступа]: <https://www.ukrinform.ua/rubric-economy/2857755-v-ukraini-skorocuetza-pogoliva-bilsosti-vidiv-silgosptvarin.html>
23. Электронный ресурс // [Режим доступа]: <https://www.ukrinform.ua/rubric-economy/3137288-za-rik-skorotilosa-pogoliva-vsih-vidiv-silgosptvarin-krim-svinej-derzstat.html>
24. J.Y. Jacela, J.M. DeRouche, M.D. Tokach, R.D. Goodband, J.L. Nelssen, D.G. Renter, S.S. Dritz. Feed additives for swine: Fact sheets – acidifiers and antibiotics // *J Swine Health Prod.* 2009;17(5):270–275
25. Cai D., Zhang B., Rao Y., Li L., Zhu J., Li J., Ma X., Chen S. Improving the utilization rate of soybean meal for efficient production of bacitracin and heterologous proteins in the aprA-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Jun;103(12):4789-4799. doi: 10.1007/s00253-019-09804-0.
26. Liu Z., Yu W., Nomura C.T., Li J., Chen S., Yang Y., Wang Q. Increased flux through the TCA cycle enhances bacitracin production by *Bacillus licheniformis* DW2. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Aug;102(16):6935-6946. doi: 10.1007/s00253-018-9133-z.

27. Farzana K., Shah S.N., Butt F.B., Awan S.B. Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. *Pak J Pharm Sci.* 2005 Jan;18(1):55-7.
28. Murphy T., Parra R., Radman R., Roy I., Harrop A., Dixon K., Keshavarz T. Novel application of oligosaccharides as elicitors for the enhancement of bacitracin A production in cultures of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40, 1518-1523.
29. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
30. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування. Львів: «Інтелект-Захід», 2008. – 736 с.
31. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf
32. Дезинфекция и Антисептика [Електронний ресурс]. – Хлорантоин – хлорсодержащие средство. – Режим доступу: <https://www.mpi-dpr.com.ua/produkcija/10-khlorantoin-khlorsoderzhasshie-sredstvo.html>
33. Эко-хим восток [Електронний ресурс]. – Средство дезинфицирующее ДЕЗЕКОН. – Режим доступу: http://eko-him.com.ua/products/7014_sredstvo_dezinficiruyushhee_dezekon_51

34. M. Rukmini, Debasish Sahoo, Jikasmitha Dalei, Ravitosh Ray. Production, purification and characterization of bacitracin from *Bacillus subtilis* // The Pharma Innovation Journal 2015; 3(12): 77-82
35. Anker HS, Johnson BA, Goldberg J, Meloney FL. Bacitracin: Methods of Production, Concentration, and Partial Purification, with a Summary of the Chemical Properties of Crude Bacitracin. *J Bacteriol.* 1948;55(2):249-255.
36. Біотехнології в екології. Методичні рекомендації до самостійної роботи студентів спеціальності 7(8).04010601 Екологія та охорона навколишнього середовища [Текст] / А.І. Горова, С.М. Лисицька, А.В. Павличенко та ін. – Д.: Національний гірничий університет, 2012. – 23 с
37. Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «Основи проектування» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»/ Укладач: Гуляєв В.М. - Кам'янське: ДДТУ, 2019 р. – 71 с.
38. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://www.alfalaval.com/products/separation/centrifugal-separators/separators/btpx/>
39. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://encyclopedia.che.engin.umich.edu/Pages/SeparationsChemical/Extractors/Extractors.html>
40. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <http://www.rousselet-robotel.com/chemical-fine-chemical-pharmaceutical/liquidliquid-centrifugal-separators-type-bxp/>
41. Електронний ресурс // [Режим доступу]: https://www.agromash.ru/0811_SER_vakuum_vypar_ap.html
42. Конспект лекцій з дисципліни «Технологія антибіотиків та лікарських препаратів» освітньо-професійної програми першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укладач: Головей О.П. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 121 с.

- 43.Електронний ресурс // [Режим доступу]:
https://www.yenchen.com.tw/en/product/Spray-Dryer/spray_dryer-331.html
- 44.Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Промислова та екологічна біотехнологія" для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 51 с
- 45.Електронний ресурс // [Режим доступу]
http://www.millab.ru/equipments/3218_hplc-agilent-1260-infinity/
- 46.Електронний ресурс // [Режим доступу]:
<https://spectroscopy-lab.ru/catalog/zhidkostnaya-khromatografiya-vezhkh/seriya-sistem-vezhkh-agilent-1260/>
- 47.[Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://bronto.ua/ro/katalog/item/326-biochemical-composition-of-soyabean>
- 48.[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://soft-agro.com/kormovoe-syre/rapsovyj-shrot-i-zhmyx-v-kormlenii-korov-svinej-i-pticy.html>
- 49.Воронич О.Г., Базель Я. Р., Студеняк Я. І., Фершал М.В. Аналіз технічних об'єктів: Навчально-методичний посібник. – Ужгород, 2016. – 72 с.
- 50.Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва» / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянц. – Харків: 2013. – 215 с.
- 51.Acharya D., Satapathy S., Das M. Extraction of bacitracin from *Bacillus subtilis* BSG and its optimization using response surface methodology // Biosci. Biotech. Res. Comm. 11(4): 710-718 (2018).
- 52.[Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://ukranalitika.com.ua/goods/analizatory-vlazhnosti-vlagomery-laboratornye/analizator-vlazhnosti-laboratornyy-ma-50-r-radwag-polsha/>
- 53.[Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3642/komprimuvannya>

54. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://kegt-rshu.in.ua/images/dustan/pl_3_6.pdf
55. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.fishbowlinventory.com/blog/2018/01/31/8-effective-ways-to-reduce-manufacturing-waste/>
56. Osman, A. I., Abdelkader, A., Farrell, C., Rooney, D., & Morgan, K. (2019). *Reusing, recycling and up-cycling of biomass: A review of practical and kinetic modelling approaches*. *Fuel Processing Technology*, 192, 179–202. doi:10.1016/j.fuproc.2019.04.026