

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кафедра біотехнології і мікробіології

(повна назва кафедри)

ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА

до дипломного проекту

бакалавр

(освітньо-кваліфікаційний рівень)

на тему «Одержання вірджиніаміцину культивуванням *Streptomyces virginiae*»

Виконала: здобувачка 3 курсу, групи 1 ск
напряму підготовки (спеціальності)

6.051401 «Біотехнологія»

(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

(прізвище та ініціали)

Керівник _____

(прізвище та ініціали)

Рецензент _____

(прізвище та ініціали)

Київ – 2022 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню біотехнології виробництва антибіотику вірджиніаміцину з використанням нового штаму актиноміцетів *Streptomyces virginiae*. На основі аналізу та порівняння потенційних продуцентів антибіотику, складу поживних середовищ для їх культивування обрано штаб *Streptomyces virginiae* IB 25-8, який порівняно з іншими штабами - *Streptomyces virginiae* ATCC 13161, *S. virginiae* ВКПМ S-1046, *Streptomyces* sp. S 15-30, *S. virginiae*.VKM Ac-2738D, є найвигіднішим при масштабному виробництві препарату.

Вірджиніаміцин - антибіотик, що відноситься до стрептограмінів і являє собою природну суміш двох макроциклічних компонентів полікетидної (М) і пептидної (S) природи. Розрахована потужність його виробництва становить 45,1 м³ культуральної рідини або 230 кг антибіотику за рік. Технологічний процес складається з допоміжних (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація 50 % розчину сахарози для підживлення, приготування та стерилізація поживного середовища) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу).

Дипломний проект складається з вступу, восьми розділів, списку використаних джерел, технологічної схеми (2 листа формату А3) та апаратурної схеми (2 листа формату А1). Загальний обсяг роботи – 78 сторінок, 6 рисунків, 12 таблиць.

Ключові слова: антибіотик, стрептоміцети, макролідичні компоненти М і S, *Streptomyces virginiae* IB 25-8, біосинтез, річна потужність.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБІОТИКА ВІРДЖІНІАМІЦИНУ.....	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. Таксономічний статус біологічного агента.....	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	25
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	25
РОЗДІЛ 4. ОБґРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	27
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	27
4.1.2. Вибір ферментера для культивування <i>Streptomyces virginiae</i> IB 25- 8.....	29
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	30
4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	31
4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	32
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	37
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	40
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	53
7.1. Мікробіологічний контроль.....	53
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	56
7.2.1. Концентрація біомаси.....	62

7.2.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту.....	56
7.2.3. Концентрація цільового продукту.....	58
7.3. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	61
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	67
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва вірджиніаміцину на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	67
8.1.1. Характеристика та оцінка рідких відходів.....	68
8.1.2. Характеристика та оцінка твердих відходів.....	68
8.1.3. Характеристика та оцінка газоподібних відходів.....	68
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	70
8.2.1. Зменшення об'єму газоподібних відходів.....	70
8.2.2. Утилізація газів.....	70
8.2.3. Зменшення об'єму рідких відходів.....	71
8.2.4. Утилізація рідких відходів.....	71
8.2.5. Переробка твердих відходів.....	72
ЛІТЕРАТУРА.....	73

ВСТУП

В сучасних умовах підтримання високого рівня виробництва м'ясної і молочної продукції пов'язане з активним використанням ветеринарних антибіотиків, світовий обсяг виробництва яких досягає майже 2/3 від загального виробництва антибіотиків в світі і оцінюється приблизно в 4 млрд. доларів США [1].

Надійне забезпечення населення м'ясної і молочної продукцією, що є основним джерелом тваринного білка, є одним з найважливіших умов досягнення продовольчої безпеки держави. Задовільнити потреби населення в м'ясі і молочних продуктах в значній мірі можна за рахунок нарощування обсягів їх виробництва в регіонах країни. Одним із способів вирішення даної проблеми є застосування біологічно активних речовин, зокрема, антибіотиків з метою профілактики захворюваності і як результат, підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин [2].

Необхідність профілактики і лікування тварин антибіотиками при бактеріальних інфекціях обумовлена наявністю критичних періодів вирощування тварин: відбирання, перегрупування, зміна стада і, як результат, спалах захворювання. Природно, що його необхідно швидко і ефективно купірувати. Застосування антибактеріальних препаратів особливо необхідно при важкому і ускладненому перебігу хвороби. У практиці ветеринарної медицини ефективність лікування залежить від правильної та своєчасної постановки діагнозу, вибору препарату з урахуванням чутливості до нього збудника, оптимальної дози, кратності введення і курсу лікування.

Необхідність використання антибіотиків у тваринництві визначається декількома факторами.

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.					ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.							6	2
Реценз.						5		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.								

По-перше, великі тваринницькі і птахівницькі господарства характеризуються тим, що велике поголів'я птахів або тварин міститься на відносно малих площах, що створює ризик масштабного поширення різних інфекцій. Так наприклад, в багатьох країнах шлунково-кишкові захворювання великої худоби являються серйозною проблемою промислового виробництва. По-друге, вирощування і утримання тварин передбачає проведення певних обробок з застосуванням медичних препаратів, в т.ч. антибіотиків. По-третє, профілактичний прийом антибіотиків рекомендується в ряді випадків при транспортуванні птиці і тварин для зняття стресу. Нарешті, деякі антибіотики використовуються для стимуляції росту сільськогосподарських тварин [3].

Найбільш поширеними антибіотичними препаратами у ветеринарії є антибіотики тетрациклінової, цефалоспориновими, аміноглікозидний, дестоміцинової і стрептограмінової груп [4].

Актуальність даної роботи обумовлена тим, що антибіотики групи стрептограмінів, до яких відноситься вірджініаміцин, успішно застосовуються у ветеринарії як терапевтичні речовини для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту птахів, свиней і великої рогатої худоби і обумовлені біологічними властивостями даних сполук, які не є токсичними або мутагенними, здатні до біодеградації, не накопичуються в тканинах тварин, і характеризуються вузьким спектром дії відносно стафілококів.

Відсутність виробництва вірджініаміцину в Україні, дає поштовх до розробки власних методик виробництва антибіотику, що є несумнівно актуальним.

Новизною даної роботи є використання штаму *Streptomyces virginiae* IB 25-8, який росте на оптимізованому поживному середовищі, яке сприяє максимальному накопиченню вірджініаміцину в культуральній рідині в процесі біосинтезу. Порівняно з *S. virginiae* VKM Ac-2738D, *Streptomyces virginiae* IB 25-8 має нижчу вартість поживного середовища та умовну вартість вірджініаміцину, маючи при цьому таку саму кількість цільового продукту (5,6 г/л).

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Вірджініаміцин - антибіотик, що відноситься до стрептограмінів і являє собою природну суміш двох макроциклічних компонентів полікетидної (М) і пептидної (S) природи [5].

Брутто-формула - $C_{43}H_{49}N_7O_{10}$, **молярна маса** становить 823 г/моль.

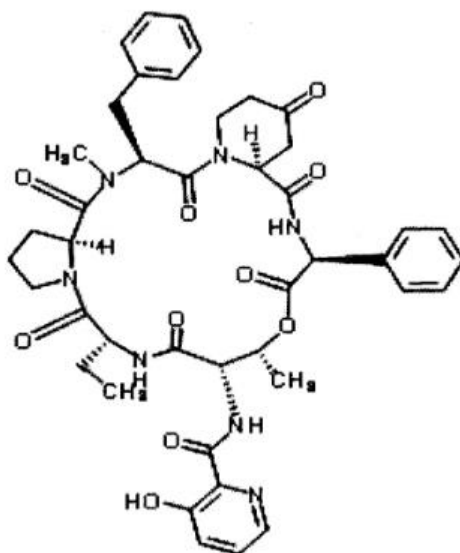


Рис.1. Структурна формула вірджініаміцину [6]

Розчинний в органічних розчинниках (метанол, хлороформ та ін.), слабо розчиняється у воді.

Основними компонентами антибіотика є фактори M1 і S1. Однією з унікальних особливостей біосинтезу вірджініаміцину є той факт, що мікроорганізм продукує одночасно обидва фактори M1 і S1, причому в співвідношенні, що забезпечує максимальну синергітичну активність в придушенні синтезу білка в клітинах чутливих мікроорганізмів [7]. Максимум синергічної дії вірджініаміцину спостерігається в присутності 25-40% S1, при якому активність M1 збільшується в 3,5-4 рази. Ця унікальна особливість пояснює відсутність суттєвої резистентності мікроорганізмів до вірджініаміцину після багатьох років інтенсивного його використання в тваринництві [8].

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.					РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ				Літ.	Арк.	Акрушів		
Перевір.											6	3	
Реценз.									7				
Н. Контр.									Кафедра БТМ				
Затверд.													

Взяті окремо, M1 і S1 мають бактеріостатичну дію, в той час як їх синергетична комбінація надає бактерицидний ефект щодо більшості грампозитивних і деяких грамнегативних бактерій [9]. Особливо ефективний вірджініаміцин (його фактор M) проти стафілококів і стрептококів, стійких до інших антибіотиків - пеніциліну, стрептоміцину, еритроміцину, тетрацикліну і ін. Фактор S активніший для бацил, але активний для кокових культур і його активність для них становить всього 3-4 % від загальної активності фактора. Крім вираженої антимікробної дії, вірджініаміцин має властивості стимулятора росту, оптимізуючи абсорбцію і метаболізм поживних речовин, покращуючи стан епітелію тонкого кишечника і пригнічуючи синтез кишкової мікрофлори токсинів і шкідливих метаболітів [10].

В даний час вірджініаміцин використовується в промисловому виробництві біоетанолу [11], а також в сільському господарстві в якості антибіотичної кормової добавки для сільськогосподарських тварин і птахів, що сприяє виживанню молодняка, зниженню захворюваності, підвищенню щоденної прибавки у вазі і поліпшенню ефективності харчування [12].

Вірджініаміцин є основним компонентом препарату "Стафак 110". При маркуванні продукції його позначають як добавку E711 [13].

Лікарська форма

Порошок для орального застосування.



Рис. 1.2. Зовнішній вигляд препарату «Стафак 110»

Фармакологічна дія

При пероральному введенні вірджініаміцин не всмоктується в шлунково-кишковому тракті і не піддається впливу травних ферментів, тому створюється його висока концентрація, що сприяє тривалому антимікробну дію в шлунково-кишковому тракті. Антибіотик не накопичується в органах і тканинах, з організму виводиться в незмінному вигляді з фекаліями.

Показання до застосування

Застосовується для профілактики і лікування некротичного ентериту у курчат-бройлерів, курей, лікування дизентерії у свиней, а також для стабілізації кишкової мікрофлори, збільшення приростів, поліпшення використання кормів.

Протипоказання до застосування

Заборонено застосовувати тваринам з нирковою недостатністю, підвищеною індивідуальною чутливістю до лікарського засобу, при появі ознак алергії.

Заборонено застосовувати птиці, яйце якої використовується в харчових цілях.

Порядок застосування

Застосовують з кормом птахам щодня в рекомендованій дозі, протягом усього періоду вирощування і припиняють застосування за 3 доби до забою.

Взаємодія з іншими лікарськими речовинами

Можливе застосування Стафак 110 одночасно з іншими антибактеріальними засобами, зокрема з хлорамфеніколом, тетрацикліном і макролідами, а також спільно з кокцидіостатиками і нестероїдними протизапальними засобами.

Умови зберігання

Термін придатності лікарського засобу при дотриманні умов зберігання - 36 місяців з дня виготовлення в закритій упаковці виробника, 6 місяців у розкритому пакеті. Зберігають в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці, при температурі від 5°C до 25°C [14].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Стрептоміцети - міцеліальні бактерії, повсюдно зустрічаються в природі, є невід'ємними учасниками життя біосфери. Беручи участь в різноманітних геохімічних процесах, вони здатні модифікувати багато з'єднань - і природних, і ксенобіотиків, маючи великий вплив на навколишнє середу і змінюючи його. У різних галузях практичної діяльності людини давно із великим успіхом використовується унікальна здатність стрептоміцетів, як групи в цілому, до синтезу величезної кількості різноманітних біологічно активних речовин. Загально визнано, що ці речовини мають дуже велике значення для клінічної медицини, мікробіологічної промисловості, сільського господарства, аквакультури та інших галузей народного господарства [15].

На сьогоднішній момент, вірджиніаміцин продукується різними штамми одного мікроорганізму *Streptomyces virginiae*.

Для забезпечення достатнього обсягу виробництва вірджиніаміціна необхідні не тільки ефективні технології його промислового виробництва, виділення і очищення, а й високопродуктивні штами-продуценти, здатні забезпечувати високий вихід даного метаболіту. Підбір оптимального складу ферментаційної середовища і її додаткових компонентів, а також умов ферментації дозволяє додатково підвищити продуктивність штаму [16].

Дані про компоненти поживного середовища, а також час, умови культивування і концентрацію цільового продукту наведено нижче в таблиці 2.1.

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ													
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА													
Розроб.													Літ.		Арк.		Акрушів	
Перевір.															6		9	
Реценз.													Кафедра БТМ					
Н. Контр.																		
Затверд.																		
					10													

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Протягом багатьох років протимікробні засоби використовуються не тільки для лікування хвороб тварин, а й як стимулятори росту, особливо в свинарстві та птахівництві. З метою підвищення ефективності відгодівлі практикують введення в корми антибіотиків у відносно малих дозах протягом тривалого періоду часу. Застосовувані в годівлі тварин антибіотики надають стимулюючу дію на їх ріст, продуктивність та відтворення, що призводить в середньому до 4-5% збільшення приросту живої маси тварин в порівнянні з контрольними групами, витрати корму на одиницю приросту знижуються на 5-8%, активізується резистентність організму, скорочується період відгодівлі тварин [21].

Одним з позитивних факторів, пов'язаних з використанням кормових антибіотиків, є зміна складу мікрофлори з патогенних на корисні види. Ця виборча модифікація мікрофлори кишечника призводить до збільшення всмоктуваності поживних речовин, поліпшенню здоров'я і цілісності шлунково-кишкового тракту тварин. В цілому засвоєння поживних речовин поліпшується на 3-5%, темпи зростання - на 3-8% [22].

3.1. Потреба у цільовому продукті

Особливе значення має використання в тваринництві антибіотиків групи вірджиніаміцина. Успішне застосування антибіотиків цієї групи обумовлено їх біологічними властивостями. Вони не токсичні і не мутагенні, не накопичуються в тканинах тварин.

Вірджиніаміцин має бактеріостатичну, а у високих концентраціях - бактерицидну дію відносно більшості грампозитивних і деяких грамнегативних бактерій, в тому числі *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, хламідій (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*) і мікоплазми (*M. pneumoniae*).

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ				Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.											
Перевір.										6	6
Реценз.									Кафедра БТМ		
Н. Контр.											
Затверд.											
					11						

Вірджиніаміцин слабо всмоктується, і в кишечнику накопичуються високі концентрації, що сприяє тривалій антимікробній дії в шлунково-кишковому тракті. З організму вірджиніаміцин виводиться через нирки і кишечник [22].

Вірджиніаміцин не є самостійним лікарським препаратом, але входить до складу «Стафак-110». В Україні даний антибактеріальний лікарський засіб не виробляється, тому його імпортують з США, де знаходиться основний виробник («Phibro Animal Health Corporation»).

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, приходить на свинину, що набагато більше, ніж на яловичину (близько 12 %). Вищенаведене обумовлює доцільність застосування кормової добавки збагаченої вірджиніаміцином саме для вигодовування свиней.

Згідно потреби корма для відгодівлі залежно від віку поросяти [23] та потреби антибіотику згідно рекомендацій [22] було складено узагальнюючу таблицю (табл. 3.1) для розуміння потреби вірджиніаміцину на різних етапах відгодівлі свиней.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в вірджиніаміцині

Вік поросяти	Доза корму на добу (г)	Доза антибіотику (г) на 1 кг корму
1 місяць	350	0,25-0,27
2 місяці	850	
3 місяці	1050	
4 місяців	1550	
5 місяців	2250	
6 місяців	2550	
7 місяців	3200	

3.2. Розрахунок потужності виробництва

На початок 2020 року близько 1,7 тисяч сільськогосподарських підприємств в Україні утримують свинопоголів'я. При цьому рушійна сила

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оскільки оптимальною температурою для культивування аеробного штаму *Streptomyces virginiae* IB 25-8 є 28 °С, а оптимальним значенням рН – 7.0, тобто нейтральне, то можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря, піногасників. Для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря. У зв'язку з викладеним вище, культивування *Streptomyces virginiae* IB 25-8 для біосинтезу вірджиніаміцину здійснюють глибинним способом в аеробних умовах.

Біосинтез вірджиніаміцину здійснюється у періодичному процесі, оскільки максимальний синтез антибіотика відбувається у стаціонарній фазі росту продуцента. Отже, «підтримання» штаму продуцента в експоненційній фазі росту є недоцільним, оскільки у цьому разі спостерігатиметься зниження концентрації антибіотику в культуральній рідині.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу вірджиніаміцину. Розрахуємо скільки вуглецю міститься в 5,6 г/л вірджиніаміцину. Молекулярна маса вірджиніаміцину становить 823. Отже у 823 г вірджиніаміцину міститься 516 г вуглецю, а у 5,6 г вірджиніаміцину $(5,6 \cdot 516) / 823 = 3,51$ г вуглецю.

Далі розрахуємо у скількох грамах сахарози міститься 3,51 г вуглецю. $X = 3,51 \cdot 342 / 144 = 8,33$ г/л.

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА				Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.											
Перевір.										6	10
Реценз.									13		
Н. Контр.									Кафедра БТМ		
Затверд.											

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Оскільки *Streptomyces virginiae* IB 25-8 є аеробом ефективного забезпечення мікроорганізмів розчиненим киснем є необхідним елементом процесу культивування. При цьому необхідною умовою вирощування глибинної культури продуцента, яка використовується при виробництві антибіотиків є асептичність, тому повітря, що подається на аерацію, має бути стерильним.

Очистка і стерилізація повітря досягаються різними способами, які передбачають перш за все знищення мікроорганізмів або їх відділення. Використовуються методи газової очистки або застосування антисептиків, підвищення або пониження температури, ультрафіолетове випромінювання, іонізуюче випромінювання. Ці складні прийоми мало економічні через високу стійкість спор і конідій до високих температур та іонізуючого випромінювання. В процесах мікробіологічного синтезу повітря, що подається на аерацію повинно бути очищене на 99,9 % від домішок і мікроорганізмів розміром до 1 мкм. Ця вимога примушує відмовитись від багатьох методів газової очистки як неефективних, що забезпечують виділення лише великих часток [27].

Для стерилізації повітря з належними характеристиками використовують два методи: знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання, наприклад, за допомогою УФ-опромінювання, та вилучення її методом фільтрування через пористі матеріали [28].

Забір атмосферного повітря для наступної його очистки здійснюють за допомогою спеціального повітрязабірника. Висота виробничої будівлі становить приблизно 5 м і для запобігання потраплянню забруднюючих часточок з виробничої будівлі у повітрязабірник його розміщують на відстані 2-3 м від даху будівлі.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

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

Таблиця 5.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу антибіотика вірджиніаміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування розчину каустичної соди	1	Реактор – змішувач РС-15 робочим об'ємом V=15 л. Матеріал – сталь AISI 316L Виробник: «Кабельфармтехніка» (Україна) ¹
H-2 H-24 H-28 H-30 H-32	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий Debem MB 120. Продуктивність 25,0 м³/год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна). ²
ПЗ-3	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-4	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр комірковий (ФЯП) фірми Airpol, серія DF (Україна). Продуктивність – 1540 м³/год. Фільтруючий матеріал – поліуретан. Е=80%. Маса 6,5 кг, розміри 190x871мм. ³
К-5	Компресор	1	Максимальний тиск 7,5 бар. Продуктивність = 650 л/хв. Гвинтові компресори «Shamal» модель GHIBLI TA 710 ⁴
T-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Робочий тиск: Ру10, Ру16 (стандарт), Ру25, Ру6 Максимальна робоча температура -180 °С Мінімальна робоча температура – 10 °С Виробник: ОПЕКС Енергосистеми, TRANTER (Швеція) ⁵
P-7	Ресивер	1	Повітрозбірник (ресивер) на 100 л. Максимальний робочий тиск: 12.0 (бар). Виробник: ТОВ «КОМПРЕСОМАШ-СЕРВІС» (Україна) ⁶
T-8	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁷

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.											
Перевір.										6	3
Реценз.									15		
Н. Контр.									Кафедра БТМ		
Затверд.											

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу антибіотику вірджиніаміцину включає в себе допоміжні роботи (приготування 6% розчину HCl, приготування та стерилізація 6% розчину NaOH, приготування 50% розчину сахарози для підживлення, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу антибіотику вірджиніаміцину наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання персоналу

Навчання персоналу забезпечує саме підприємство. На підприємстві існують такі 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 – спиртові антисептики.

ДР 1.2 Підготовка миючих, дезінфікуючих та миючо-дезінфікуючих розчинів

В реактори через об'ємно-ваговий дозатор, який встановлено на трубопроводі, надходить потрібна кількість дезінфекційного або миючого

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.					РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ				Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.											6	13
Реценз.									Кафедра БТМ ¹⁶			
Н. Контр.												
Затверд.												

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Зважаючи на те, що культивування *Streptomyces virginiae* IB 25-8 з метою одержання вірджиніаміцину проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій.

Посіви здійснюють шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єма проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами закривають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА.

На поверхні поживного середовища візуально визначають відсутність ознак росту сторонньої мікрофлори.

Мікробіологічний контроль чистоти культури

Здійснюється двома шляхами: висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання. Висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з поживним середовищем Гаузе № 1.

					НУХТ БТЕК 04.02.02. КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА				Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.											
Перевір.										6	13
Реценз.									17		
Н. Контр.									Кафедра БТМ		
Затверд.											

При культивуванні на середовищі Гаузе-1 штам утворює злегка опуклі круглі колонії діаметром 7-9 мм. Поверхня колонії гладка, спори сірого кольору, по краях колоній вузький (0,5 мм) ободок білого кольору. Субстратний міцелій коричневий. Навколо колонії - нечітка зона гідролізу крохмалю діаметром 3-5 мм [16].



Рис. 7.1. Колонії штаму *Streptomyces virginiae* IB 25-8 на агаризованому середовищі Гаузе № 1

Перед проведенням мікроскопіювання необхідно зафарбувати *Streptomyces virginiae* IB 25-8 за Грамом.

Фарбування за Грамом

Підготовка матеріалу для фарбування

Матеріал, що досліджується, розподіляють тонким шаром по поверхні ретельно знежиреного скла. Приготований мазок висушують на повітрі і після повного висихання фіксують.

Техніка фарбування за методом Грама

1. На предметному склі готують мазок досліджуваної культури бактерій.
2. Висушують його на повітрі, фіксують у полум'ї спиртівки.
3. На фіксований мазок наносять достатню кількість розчину карболового генціанвіолету, витримують 1–2 хв.
4. Барвник зливають і, не змиваючи водою, обробляють мазок розчином Люголя до почорніння (приблизно 1–2 хв).

7.3. Точки контролю виробництва вірджиніаміцину

Таблиця 7.1

Таблиця точок контролю виробництва вірджиніаміцину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.2 <i>Підготовка робочого розчину кальцинованої соди</i>	Концентрація розчину кальцинованої соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2 %
Кт 1.3.1. <i>Миття та ополіскування обладнання та комунікацій</i>	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	t = 50-60 °С, τ = 60 хв, чисте обладнання
Кт 1.3.3. <i>Перевірка на герметичність</i>	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 МПа, τ = 30–60 хв, ΔP < 0,01 Мпа
Кт 1.3.4. <i>Стерилізація обладнання</i>	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 °С, τ = 1 год, P = 0,003–0,005 МПа
Кт 2.2. <i>Попереднє грубе очищення повітря</i>	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. <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний,	Після компресування повітря	P = 0,4 МПа,

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва вірджиніаміцину

Проектована технологія отримання вірджиніаміцину включає доферментаційні процеси (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація поживного середовища для культивування), ферментаційні процеси (отримання посівного матеріалу, виробниче культивування).

Для розуміння і обрахунку відходів виробництва нижче подано узагальнюючу таблицю (див. табл. 8.1):

Таблиця 8.1

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 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	Рідкі відходи та газоподібні відходи	Процес утилізації необхідний лише у випадку порушення асептичності (наявність сторонньої мікробіоти). Цільовий продукт накопичується в клітинах міцелію, тому нас цікавить лише біомаса. 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 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА				Літ.	Арк.	Акрушів		
Розроб.											6	7	
Перевір.									Кафедра БТМ				
Реценз.													
Н. Контр.													
Затверд.													

Таблиця 8.2

Відходи при виробництві вірджиніаміцину

Етап виробництва, який є місцем утворення відходів	Складові відходів	Приблизні об'єми за виробничий цикл	Клас небезпеки
Миття та ополіскування обладнання	Каустичної соди , бруд	932 л (69900 л за рік)	2 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 0,25% робочий розчин Гембару Активно діюча речовина – гуанідинова полімерна сполука, що є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук. Не містить лугу, альдегиду, фенолу, окислювальних і хлорпохідних сполук.	1645 л (123288 л за рік)	3 клас
Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м ³	Відпрацьоване повітря (CO ₂), пил	28,1 м ³	4 клас
	Культуральна рідина	480 л	3 клас

ЛИТЕРАТУРА

1. Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.*, 3099(14), 1–9.
2. Cocito C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components // *Microbiol. Rev.* – 1979. – V. 43. – P. 145-198
3. Hoyzman, A., Staroselsky, A., Ashash, U., Tarasova, K.S., Elisova, T.V. (2011). Vliyanie preparata Stafac®110 na produktivnost tsyplyat-broilerov v promyshlennykh usloviyakh Rossii. *Ptitsevodstvo*, 7, 30-32 (in Russian).
4. Ives S.E., Titgemeyer E.C., Nagaraia T.G., del Barrio A., Bindel D.J., Hollis L.C. Effect of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed // *J. Anim. Sci.* – 2002. – V. 80. – P. 3005-3015.
5. Pietra F. 2002. Biodiversity and natural product diversity. – Pergamon: Elsevier. – P. 30.
6. Новак Н.В., Савельева В.В., Глаголев В.И., Савушкин В.А., Попова Е.Д., Глаголева Е.В., Джавахия В.В., Овчинников А.И., Петухов Д.В. Штамм *Streptomyces virginiae* - продуцент вирджиниамицина и способ получения вирджиниамицина. Оpubл.: 29.12.2017.
7. Di Giambattista M., Chinali G., Cocito C. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1989. – Vol. 24. – P. 485–507.
8. Mast Y., Wohlleben W. Streptogramins – two are better than one! // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2014. – V. 304. – P. 44-50.
9. Грозина А.А., Пронин В.В., Дюмин М.С. Морфологическая оценка стенки кишечника цыплят кросса «Кобб 500» на фоне применения антибиотика и пробиотика // *Российский ветеринарный журнал.* – 2014. – № 4. – С. 16-17.