

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ **Валентина ПОЛЩУК**

«10» червня 2023р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва гентаміцину.

Дільниця підготовки посівного матеріалу»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-91

Головач Олена Олександрівна _____

Керівник:

Асистент каф. пром. біотехнології та біофармації

Піць Вадим Вікторович _____

**Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:**

к.т.н., доц., доцент кафедри біотехніки та інженерії

Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

д.б.н., професор каф. біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Горго Юрій Павлович _____

**Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних
посилань.**

Студентка _____

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 9108.00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	79	
3	A1	ДП 9108.01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 9108.02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 9108.03.000 ТК	Інокулятор	1	

				ДП 9108 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Головач О.О.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Піць В.В.				1	79
Консульт.	Шибецький В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-91	
Н/контр.						
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛЩУК

«19» квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студентці

Головач Олені Олександрівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва гентаміцину. Дільниця підготовки посівного матеріалу», керівник проєкту Піць Вадим Вікторович, асистент, затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1888-с.
2. Термін подання студентом проєкту 10.06.2023 р.
3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт – порошок гентаміцину для ветеринарного застосування; ферментер для промислового культивування - об'єм 5 м³; спосіб очистки продукту – іонообмінна хроматографія.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва гентаміцину; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції інокулятора, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду інокулятора – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю. доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	19.04.23-25.04.23 р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	25.04.23-30.04.23 р.	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	30.04.23-05.05.23 р.	
4.	Технологічна частина	10.05.23-15.05.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	15.05.23-20.05.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	20.05.23-25.05.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки	26.05.23-30.05.23 р.	
8.	Подання дипломного проєкту на рецензування	31.05.23-05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проєкту та рецензії до екзаменаційної комісії	до 10.06.23 р.	

Студент

Олена ГОЛОВАЧ

Керівник

Вадим ПІЦЬ

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: « Технологія виробництва гентаміцину.
Дільниця підготовки посівного матеріалу »**

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить 79 ст., 11 рис., 12 табл., 1 схема, 22 посилання.

Робота присвячена технології виробництва гентаміцину – аміноглікозидний антибіотик ветеринарного призначення, зокрема ділянки підготовки посівного матеріалу.

Продуцентом є штам *Micromonospora purpurea* ATCC 15835 було обрано поживне середовище на основі картопляного крохмалю. Культивування проводиться протягом 96 годин при температурі 32°C, рН 7,0 та аерацією 1м³/м³ середовища.

Розрахована та обрана конструкція інокулятора, що забезпечує отримання посівного матеріалу належної якості. Наведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки даного інокулятора.

Відповідно до вимог кінцевої продукції розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва.

Розроблена технологія виробництва гентаміцину відповідає санітарно-гігієнічним, екологічним нормам, техніці безпеки та охороні праці.

ГЕНТАМІЦИН, АНТИБІОТИК, ПРОДУЦЕНТ, *MICROMONOSPORA PURPUREA*, ПІДГОТОВКА ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
					РЕФЕРАТ	Стадія	Аркцш	Аркцшів
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата			5	79
Розроб.		Головач О.О.				КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		
Конс.								
Керівн.		Піць В.В.						
Затверд.								

ABSTRACT

The work is devoted to the production technology of gentamicin, an aminoglycoside antibiotic for veterinary use, in particular, the preparation of seed.

The producer is a strain of *Micromonospora purpurea* ATCC 15835, and a potato starch-based nutrient medium was chosen. Cultivation is carried out for 96 hours at a temperature of 32°C, pH 7.0 and aeration of 1 m³/m³ of medium.

The design of the inoculant was calculated and selected, which ensures the production of seed of proper quality. The technological, structural, and thermal calculations of this inoculant are presented.

In accordance with the requirements of the final product, the technological and hardware production schemes were developed.

The developed technology for the production of gentamicin complies with sanitary and hygienic, environmental, safety and labor protection standards.

GENTAMICIN, ANTIBIOTIC, PRODUCER, MICROMONOSPORA PURPUREA, PREPARATION OF SEED.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Стадія	Аркцш	Аркцшів
Розроб.		Головач О.О.					6	79
Конс.								
Керівн.		Піць В.В.				КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1 Основні промислові продуценти.....	11
1.2 Систематичне положення.....	12
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	12
1.4 Культуральні ознаки.....	13
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	16
1.6 Поширення в природі.....	18
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	20
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	20
2.2 Схема хімічних перетворень.....	22
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	23
2.4 Методи очистки цільового продукту.....	25
2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	26
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	28
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	28
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуцента.....	28
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	33
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	35
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	35
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	36

					<i>ДП БТ9108.00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Головач О.О.</i>			<i>ЗМІСТ</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркш</i>
<i>Конс.</i>							<i>79</i>
						<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>	
<i>Керівн.</i>		<i>Піць В.В.</i>					
<i>Затверд.</i>							

4.3	Опис технологічного процесу.....	39
4.4	Матеріальний баланс.....	50
4.5	Контроль виробництва.....	52
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....		63
5.1	Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	63
5.2	Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	66
5.3	Вибір загальнозаводського обладнання.....	73
5.4	Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	73
ВИСНОВКИ.....		76
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....		77

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						8
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

ВСТУП

В даному проєкті розглядається виробничий біосинтез гентаміцину, котрий використовується у ветеринарії.

Гентаміцин відноситься до аміноглікозидів з широким спектром дії, тобто має бактерицидний ефект до грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Маючи такі властивості, препарат набув широкого застосування у ветеринарії для лікування інфекційно-запальних захворювань. В залежності від лікарської форми, препарат гентаміцину використовують для терапії ран, опіків, фурункульозу, сепсису, пневмонії, циститу, інфекції кісток та суглобів, кон'юнктивіту і т.д[1].

В наш час різко зростає кількість інфекцій, спричинених мультирезистентними бактеріями, тому аміноглікозиди набувають все більшої популярності, так як є одним із небагатьох способів лікування, що залишиться, передусім відносно грамнегативних бактерій[2].

Особливо різке зростання світового ринку гентаміцину спостерігалось після спалаху COVID-19, проте навіть через 3 роки від початку пандемії, тенденція залишається незмінною. Згідно із даними світових економічних видань, ринок гентаміцину досягне розміру в мільйони доларів США до 2028 року. Тому доцільним є розвиток та удосконалення технологій його виробництва[3].

Виробництво гентаміцину біотехнологічним способом дозволяє підвищити ефективність та вихід продукту за допомогою удосконалення методів культивування та підбору нових штамів. Також важливою перевагою є можливість оптимізації виробництва, задля отримання більш чистого вихідного продукту, зниження собівартості та автоматизації процесів[4].

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
					ВСТУП	Стадія	Аркш	Аркшів
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			9	79
Розроб.		Головач О.О.				КПІ ім. І. Сікорського,		
Конс.						ФБТ		
Керівн.		Піць В.В.						
Затверд.								

Метою даного проєкту є розробка ефективної технології виробництва гентаміцину з використанням продуцента *Micronospora purpurea* ATCC15835 і створення відповідної технологічної документації.

Задачі для реалізації мети:

1. Обрати мікроорганізм-продуцент гентаміцину, вивчити його характеристики (культуральні, фізіолого-біологічні, морфолого-цитологічні ознаки).
2. На основі опрацьованих джерел представити схему створення високопродуктивного промислового продуцента.
3. Обґрунтувати технологічні показники виробничого процесу, що обумовлюються особливостями біологічного агенту.
4. Розробити технологію отримання продукту, а саме його виділення та очистки, зважаючи на економічні показники, простоту впровадження та ефективність.
5. Розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва гентаміцину.
6. Обґрунтувати вибір інокулятора та розрахувати його технічні показники для ділянки підготовки посівного матеріалу.
7. Розробити основні вимоги правил техніки безпеки та охорони праці, на основі аналізу небезпечних факторів виробництва гентаміцину.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Гентаміцин – це аміноглікозидний антибіотик широкого спектру дії, що набуває все більшої популярності останнім часом. Продуцентами даного антибіотику є різні види роду *Micromonospora*.

Актиноміцети, до яких належить рід *Micromonospora*, є однією із найчисленніших груп бактерій та зустрічаються у різних як природних, так і штучних середовищах. Ці мікроорганізми здатні утворювати гіфи, що розгалужуються на певному етапі свого існування, проте зазвичай цієї морфологічної ознаки недостатньо, аби відрізнити актиноміцетів від інших грампозитивних бактерій із перехідним міцелієм. Більшість представників актиноміцетів є суворими сапрофітами, проте також зустрічаються паразитичні або мутуалістичні форми існування[5].

Рід *Micromonospora* вперше був описаний Орсковим у 1923 році, а пізніше у 1932 році Єнсен розширив його до 20 видів. Саме вчений Єнсен описав 7 поживних середовищ, які можна використовувати для виділення бактерій даного роду. Лише через роки дослідження у 1942 році дослідник Вельш повідомив про антибіотичну активність роду *Micromonospora*, що слугувало початком активного вивчення та відкриттів нових антибіотиків[6].

Види, що належать до роду *Micromonospora*, – це грампозитивні бактерії, від аеробних до мікроаерофільних, чутливі до рН нижче 5,0 та мають оптимальні умови культивування від 20 до 40°C. Також деякі представники продукують каротиноїдні міцеліальні пігменти, в результаті чого утворюються колонії різних кольорів: жовті, червоні, помаранчеві, коричневі, фіолетові,

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркш	Аркшів
Розроб.		Головач О.О.					11	79
Конс.						КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Піць В.В.						
Затверд.								

чорні[7].

Micromonospora є одним з найбільш продуктивних продуцентів біологічно активних вторинних метаболітів після стрептоміцетів. Існує понад 740 штамів даного роду, що продукують велику різноманітність хімічних структур. Проте продуцентами гентаміцину є три види – це *Micromonospora purpurea*, *Micromonospora echinospora*, *Micromonospora rosarea*. Перевагою обраного вида - *Micromonospora purpurea* є його детальне вивчення, завдяки чому можна створити високопродуктивний виробничий штам.

1.2 Систематичне положення

Обраним продуцентом гентаміцину є штам *Micromonospora purpurea* ATCC 15835, що згідно визначника Берджі має наступну класифікацію:

Надцарство: *Procaryota*

Царство: *Bacteria, Bacteriobiota*

Відділ: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Підклас: *Actinobacteridae*

Порядок: *Actinomycetales*

Підпорядок: *Micromonosporineae*

Родина: *Micromonosporaceae*

Рід: *Micromonospora*

Вид: *Micromonospora purpurea*[8].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Micromonospora purpurea має добре розвинений, розгалужений, субстратний міцелій, що в діаметрі досягає 0,2-0,6 мкм. Повітряний міцелій відсутній.

Як випливає з назви роду, *Micromonospora purpurea* має поодинокі спори, що безпосередньо прикріплені до субстратного міцелію або переносяться на коротких спорофорах, котрі мають вигляд розгалужених скупчень або поодинокі.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		12

Спороношення помірне, потребує 2-3 тижні для завершення. Спори мають кулясту форму та діаметр 0,7-1,5 мкм. Також на своїй поверхні спори мають тупі колючі виступи (рис.1.1)[9].



Рисунок 1.1 Електронна мікроскопія *Micromonospora purpurea* NRRL 2985[9].

Bar = 0,5 мкм.

Спорогенез включає формування спороносного септуму, за яким слідує дозрівання спори з подальшим потовщенням шарів стінки. Вивільнення спор сприяє розтягненню гіфальної стінки біля спороносної перегородки. За допомогою потовщення стінок зрілі спори мають фізичну та хімічну стійкість: їх життєздатність помітно знижуються лише при температурі вище 75°C, стійкі до висихання, а також залишаються життєздатними в ґрунті або мулі протягом тривалого часу[9].

1.4 Культуральні ознаки

Штам *Micromonospora purpurea* утворює припідняті колонії (рис. 1.2) на агаризованих середовищах. Колонії спочатку мають блідо-жовтий колір, а потім набувають темно-фіолетового забарвлення. Старі колонії зазвичай вкриті

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

коричнево-чорною слизовою масою спор. Спори часто зустрічаються в щільних скупченнях і можуть утворюватися в окремих ділянках на поверхні або повністю занурені в субстрат[9].

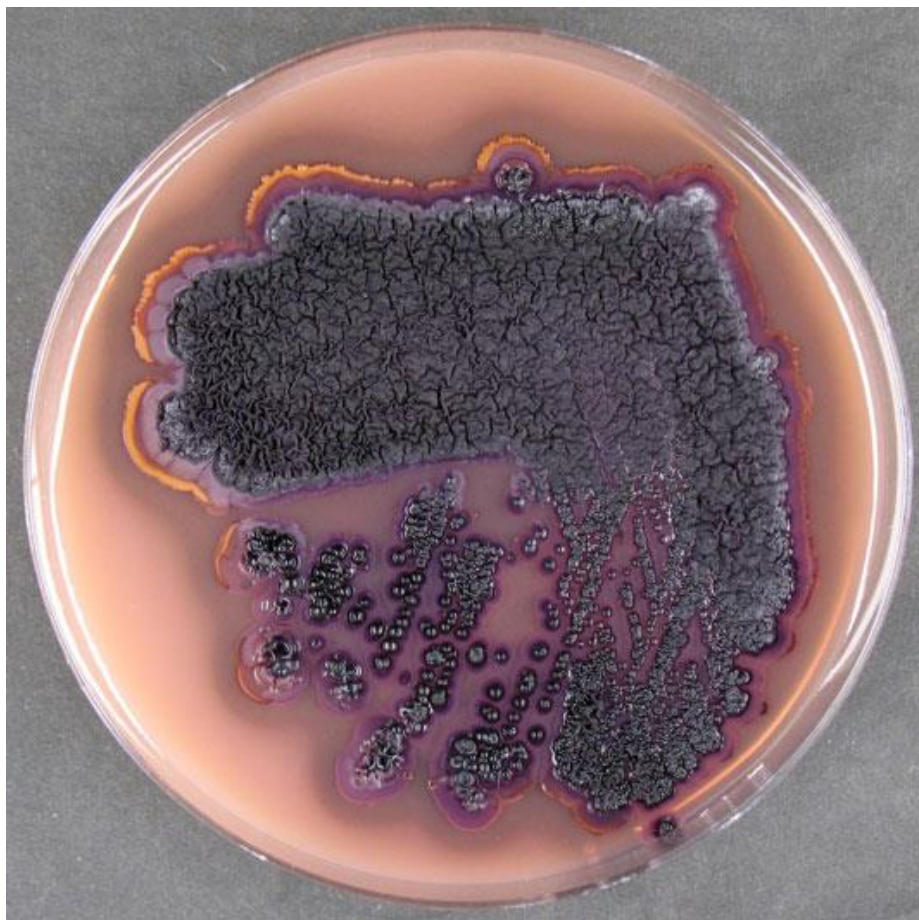


Рисунок 1.2 Колонія *Micromonospora purpurea*[10].

Також вивчено ріст даної культури на різних середовищах (див. табл. 1.1)[8]:

Таблиця 1.1 Ріст *Micromonospora purpurea* на середовищах із різними джерелами вуглецю:

Середовище	Наявність росту	Колір колонії
агар Чапека з сахарозою	+	фіолетовий
джерело вуглеводів гліцерол	-	-

Продовження табл. 1.1

джерело вуглеводів α -мелібіоза	-	-
джерело вуглеводів D-рибоза	-	-
джерело вуглеводів L-рамноза	+	фіолетовий
джерело вуглеводів рефіноза	-	-
джерело вуглеводів інозитол	-	-
джерело вуглеводів D-манітол	-	-

Як єдині джерела вуглецю використовуються арабіноза, целобіоза, глюкоза, маноза, сахароза, трегалоза, розчинний крохмаль і ксилоза.

Також вивчено ріст культури на агаризованих середовищах, що описано у таблиці 1.2[8]:

Таблиця 1.2 Ріст *Micromonospora purpurea* на агаризованих середовищах:

Назва середовища	Ріст	Субстратний міцелій
Агар Гаузе-1	Наявний	Темно-фіолетовий
Агар Г-1 з гороховим борошном і крохмалем	Наявний	Темно-фіолетовий
Агар вівсяний	Наявний	Сіро-фіолетовий

Продовження табл. 1.2

Агар Беннета	Наявний	Сіро-фіолетовий
Агар кукурудзяний	Наявний	Сіро-фіолетовий
Агар Гаузе-2	Наявний	Темно-фіолетовий
Агар тирозиновий	Слабкий	Сірий

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Бактерії є грампозитивними, аеробними, мезофільними, некислотостійкими. *Micromonospora purpurea* є чутливим до рН нижче 5,0. Зростання відбувається в діапазоні температур від 20 до 40°C.

Клітинна стінка даного виду відноситься до II типу. Гідролізати клітинної стінки можуть містити гліцин, глютамінову кислоту, діаміннопімелінову кислоту та D-аланін. Клітинні цукри арабіноза та ксилоза є складовими клітинної стінки, хоча в гідролізатах цілого організму також присутні глюкоза, галактоза, маноза і рамноза[9].

До характерних фосфоліпідів можна віднести: фосфатидилгліцерол, фосфатидилетаноламін, фосфатидилінозитол і манозиди фосфатидилінозиту. Також було ідентифіковано наявність гліколіпідів, диглюкозилдигліцеридів, етерів трегалози та жирні кислоти. Переважають ізо- та антеізо-розгалужені жирні кислоти. Структура жирних кислот відноситься до типу 3b з насиченими та ненасиченими жирними кислотами, включаючи C15:0 антеізо, C17:0 антеізо, C17:0 10-метил, C18:0 10-метил, C16:0 ізо, C15:0 ізо та C17:0 ізо кислоти. Міколієві та циклічні жирні кислоти відсутні[9].

У роду *Micromonospora* було описано різноманітні літичні та помірні фаги, а також фаги без охарактеризованих інфекційних циклів. Також наявні плазмідні, на основі яких було розроблено численні вектори-хазяїни[9].

Для даного штаму було детально вивчено вплив різних джерел вуглецю на його ріст (див. табл. 1.3)[10].

Таблиця 1.3 Вплив різних джерел вуглецю на ріст штаму

Джерело вуглецю	Кінцевий рН	Вміст сухої біомаси в культуральній рідині, мг/мл	Відносна активність гентаміцину
Картопляний крохмаль	7,23	17	1,00
Глюкоза	7,17	13,2	1,03
Цукроза	7,07	14,8	0,77
Кукурудзяний крохмаль	7,13	15,2	0,93
Лактоза	8,01	4,0	0,13

З отриманих даних можна визначити, що картопляний крохмаль є найкращим джерелом вуглецю для накопичення біомаси *Micromonospora purpurea*.

Аналогічно було досліджено вплив різних джерел азоту. Результати даного експерименту представлено у таблиці 1.4[10].

Таблиця 1.4 Вплив різних джерел азоту на ріст штаму

Джерело вуглецю	Кінцевий рН	Вміст вологої біомаси, мл/10 мл культуральної рідини	Відносна активність гентаміцину
Соєвий шрот	7,04	3,1	1,00
Соєве борошно	6,98	3,0	0,87
Кукурудзяний екстракт	6,34	3,0	0,5

Отримані результати демонструють, що використання соєвого шроту або борошна є кращим, ніж застосування кукурудзяного екстракту.

Ще одним фактором впливу на ріст культури та продукцію гентаміцину є додавання до субстрату іонів Mg^{2+} (із $MgSO_4$) (див. табл. 1.5) та Co^{2+} (із $CoCl_2$) (див. табл. 1.6) [10].

Таблиця 1.5 Вплив іонів Mg^{2+}

Концентрація іонів	Кінцевий рН	Вміст сухої біомаси в культуральній рідині, мг/мг	Відносна активність гентаміцину
0	7,04	22,0	1,00
5	6,89	19,0	0,87
10	6,99	19,8	0,95
20	6,88	22,0	0,6

Таблиця 1.6 Вплив іонів Co^{2+}

Концентрація іонів	Кінцевий pH	Вміст сухої біомаси в культуральній рідині, мг/мг	Відносна активність гентаміцину
0	6,98	22,2	0,16
0,0013	7,09	20,21	1,00
0,006	7,11	20,96	1,40
0,01	7,07	20,0	1,31

Таким чином додавання до поживного середовища 0,55% MgSO_4 та 0,006 г/л CoCl_2 підвищує вихід біомаси та збільшує відносну активність отриманого гентаміцину.

1.6 Поширення у природі

Толерантність *Micromonospora purpurea* до низьких концентрацій кисню дозволяє припустити, що вони можуть рости в мікроаерофільних умовах, що зустрічаються в алювіальних ґрунтах, заплавах луків та вологих ґрунтах річкових екосистем. Штами мікромоноспор переважають в угрупованнях актиноміцетів, ізольованих з рослинної підстилки, лишайників, коренів та органічних горизонтів ґрунту. Їх широке розповсюдження навіть у рослинних посушливих зонах пояснюється їхньою здатністю руйнувати біополімери. Види *Micromonospora* були ізольовані з різноманітних морських біотопів, включаючи прибережні райони, солончаків та глибоководних відкладів. Протягом багатьох років було широко протягом багатьох років вважалося, що спори *Micromonospora* вимиваються з ґрунтів і накопичуються як спочиваючі спори в озерних і морських відкладеннях. Незважаючи на попередні дані, що свідчать про адаптацію актиноміцетів до морського середовища та існування місцевої морської популяції було продемонстровано активний ріст міцелію в частинках піску[9].

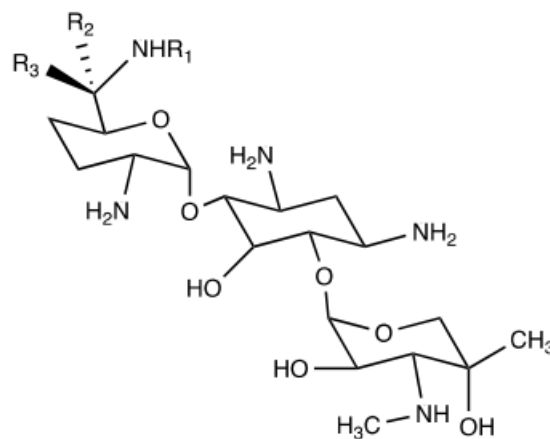
					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика цільового продукту

Гентаміцин – це аміноглікозид широкого спектру дії, водорозчинний антибіотик, важливий протиінфекційний препарат для ветеринарного застосування. Гентаміцин С складається із п'яти основних компонентів: C1, C1a, C2, C2a, C2b[12].

П'ять компонентів головним чином відрізняються один від одного сайтами модифікації метилювання, що зображено на рисунку 2.1.



	Gentamicin C1	C1a	C2	C2a	C2b
R1	CH ₃	H	H	H	CH ₃
R2	H	H	H	CH ₃	H
R3	CH ₃	H	CH ₃	H	H

Рисунок 2.1 Загальна структура компонентів гентаміцину С[12].

Основні компоненти відрізняються ступенем метилювання в 2-аміногексозному кільці. У гентаміцину C1a відсутні метильні групи в цьому кільці, тоді як C1 і C2 мають метильну групу в положенні 6'. Гентаміцин C1 також є N-метилованим у цьому положенні, тоді як C1a і C2 замість них

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата			
Розроб.	Головач О.О.				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркцш
Конс.							Аркцшів
							20
Керівн.	Піць В.В.					КПІ ім. І. Сікорського,	
Затверд.						ФБТ	

містять вільні аміни. С2 компонент складається з двох стереоізомерів (С2 і С2а). Варто зауважити, що різниця в хімічній структурі між компонентами гентаміцину по суті подібна до різниці між гентаміцинами та деякими іншими аміноглікозидами, такими як тобраміцин і нетилміцин. Також було визнано, що існує велика варіація у співвідношенні компонентів між різними фармацевтичними препаратами гентаміцину[13].

Гентаміцин, як і всі аміноглікозидні антибіотики, нефротоксичний і ототоксичний. Нефротоксичність спостерігалася у 17%, а ототоксичність — у 8% тварин, які отримували гентаміцин, але в деяких видів цифри могли бути вищими.

Згідно Державної Фармакопеї України препарат гентаміцину повинен мати наступні властивості та проходити такі випробування[14]:

Опис. Порошок білого або майже білого кольору

Розчинність. Препарат легко розчинний у воді та майже не розчинний у ефірі та 96% спирті.

Ідентифікація. Здійснюється за допомогою тонкошарової хроматографії на якій мають проявлятися чотири піки, котрі мають час утримування як піки розчину порівняння, та три основні плями на рівня плям розчину порівняння.

Прозорість розчину. Розчин 0,8 г субстанції гентаміцину у 20 мл води має бути прозорим.

Кольоровість розчину. Кольоровість розчину із попереднього дослідження не має бути інтенсивнішою за еталон 6 шкали найбільш підхожого кольору.

рН. Від 3,5 до 5,5.

Питоме оптичне обертання. При переводі на безводну речовину має складати від +107° до +121°.

Метанол. вміст має не перевищувати 1,0%. Перевірка здійснюється за допомогою газової хроматографії.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.2 Схема хімічних перетворень

Існує дві основні гілки біосинтезу гентаміцину починаючи зі сполуки гентаміцину X2. Вона може бути дегідрогенізована безпосередньо GenQ; але вона також може бути дегідрогенізована GenQ після метилювання в проміжний продукт під назвою G418 за допомогою GenK.

Додаткова метильна група, додана GenK, відрізняє гентаміцин C1a від C2a. А потім ще два ферменти (GenB2 і GenL) залучені, щоб додати ще більше різноманітності C1a і C2a: C1a метилюється в C2b; C2a епімеризується в C2, який потім може бути метильований в C1. Вибиваючи певні гени, що кодують ці ферменти, можна спрямувати потік шляху біосинтезу так, щоб максимально ефективно використовувати обмежені ресурси[12].

Таким чином, виключивши обидва гени GenK і GenL, можна отримати штам, що продукує виключно гентаміцин C1a, як показано на малюнку 2.2.

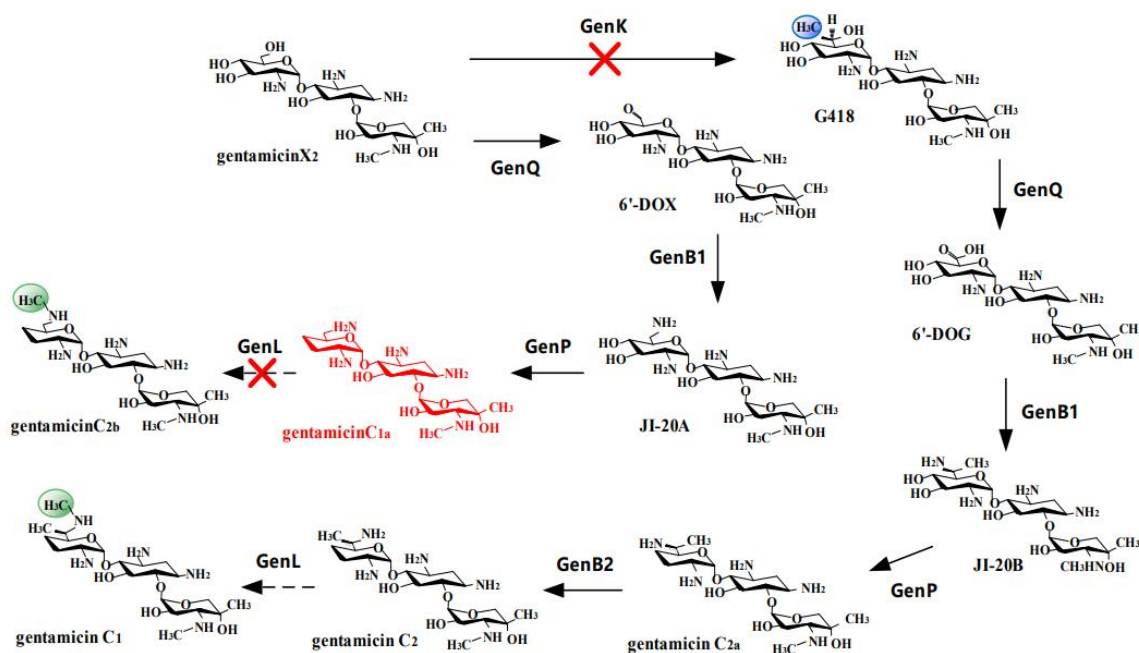


Рисунок 2.2 Біосинтез гентаміцину С у *M. purpurea*. Зображено два основних шляхи починаючи з гентаміцину X2: (1) шлях

GenK→GenQ→GenB1→GenP→GenB2→GenL продукує гентаміцин C2a, C2 і C1; (2) шлях GenQ→GenB1→GenP→GenL виробляє гентаміцин C1a і C2b[12].

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

Також було досліджено, що *genK* є S-аденозилметіонін залежним геном метилювання і відповідає за C-6' метилювання *genP* відповідає за 3', 4' подвійне дегідроксилювання; *genQ* пов'язаний з дегідруванням C-6' гентаміцину; *genB1* каталізує перетворення G418 в Л-20В та Х2 в Л-20А; *genB2* бере участь в епімеризації гентаміцину C2 і C2a in vitro; а *genL*, як повідомляється, відповідає за перетворення C1a в C2b і C2 в C1[12].

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Компонентний склад отриманого препарату визначають за допомогою рідинної хроматографії. Для даного випробування необхідні умови, що наведені нижче[14].

Колонка:

- Матеріал: нержавіюча сталь
- Розмір 0,10-0,125 м × 4,6-5,0 мм
- Наповнювач: силікагель октадецилсилільний
- Розмір часток: 5 мкм

Рухома фаза:

Розчин 5,5 г натрій глутаносульфату у 50 мл льодяної оцтової кислоти, 250 мл води та 700 мл метанолу.

Швидкість рухомої фази:

1,5 мл/хв

Детектор:

- Спектрофотометричний
- Об'єм кювети 10 мкм
- Довжина хвилі 330 нм

Випробовуваний розчин для хроматографування готується наступним чином: у воді розчинити 0,10 г субстанції гентаміцину та довести розчинником до 100,0 мл. Відібрати 10 мл отриманого розчину та додати до нього 5 мл

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

метанолу та 2 мл реактиву фталевого альдегіду. Довести до 25,0 мл метанолом. Розчин нагріти на водяній бані при 60°C протягом 15 хв, після чого охолодити до кімнатної температури.

При використанні методу рідинної хроматографії необхідним також є наявність розчину порівняння. Його приготування відбувається аналогічно до приготування випробовуваного розчину, однак замість субстанції використовується 0,10 г фармакопейний стандартний зразок гентаміцину сульфату.

Вміст компонентів, отриманий в результаті хроматографування, має бути таким:

- C1 – від 25,0% до 50,0%
- C1a – від 10,0% до 35,0%
- Сума C2 і C2a – від 25,0% до 55%

Також перевіряється вміст води, сульфатної золи та сульфатів. Всі дані для цього визначення наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 Вміст компонентів субстанції гентаміцину[14].

Компонент	Кількість субстанції, необхідної для визначення	Вміст
Вода	0,300 г	Не більше 15,0%
Сульфатна зола	0,50 г	Не більше 1,0%
Сульфати	0,250 г	Від 32,0% до 35,0% у перерахунку на безводну речовину

2.4 Методи очистки цільового продукту

Гентаміцин – це суміш, що складається з чотирьох основних компонентів C1a, C1, C2a і C2, а також численних другорядних компонентів. Крім того, гентаміцин є водорозчинною і сполукою, яка не має хромофорів, що поглинають ультрафіолетове випромінювання. Таким чином, ці характеристики гентаміцину роблять хроматографічне розділення більш складним і проблематичним порівняно з іншими антибіотиками[15].

У 1963 році Rosselet³³ вперше повідомили про виділення комплексу гентаміцину за допомогою іонообмінної хроматографії. Цей метод базується на взаємодії заряджених частинок гентаміцину з іонними обмінними смолами. За допомогою певних буферів та режимів елюєнції, різні компоненти гентаміцину можуть бути відокремлені та очищені. Різні іонообмінні процедури продовжують широко використовуватися для розділення та очищення гентаміцину в препаративних масштабах. Найпоширенішою процедурою є доведення всього бульйону до рН 2 за допомогою сірчаної кислоти, після чого до нього застосовують фільтрацію. Після доведення до рН 7 нейтралізований фільтрат пропускають через смоляну колонку IRC-50 в амонієвий цикл, після чого антибіотик елюють 2N водним аміаком. Комплекс гентаміцину С можна виділити з мінорних компонентів, що утворюються, за допомогою колонки Dowex 1x2[16].

Використання іонообмінної хроматографії для очистки гентаміцину має ряд переваг:

1. Отримання високоочищеного препарату, чистота понад 95%.
2. Легке використання технології на різних масштабах виробництва – від лабораторних до промислових.
3. Здатність повторного використання смоли, що використовується при хроматографуванні за допомогою регенерації, що підвищує економічну доцільність методу.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Аміноглікозиди є незворотними інгібіторами синтезу білка, але точний механізм бактерицидної активності не відомий. Початковою подією є пасивна дифузія через поринові канали через зовнішню мембрану. Потім лікарський засіб активно транспортується через клітинну мембрану в цитоплазму за допомогою кисневозалежного процесу. Трансмембранний електрохімічний градієнт постачає енергію для цього процесу, а транспорт пов'язаний з протонним насосом. Низький позаклітинний рН і анаеробні умови інгібують транспорт, зменшуючи градієнт. Транспорт може бути посилений препаратами, що діють на клітинну стінку, такими як пеніцилін або ванкоміцин; це посилення може бути основою синергізму цих антибіотиків з аміноглікозидами.

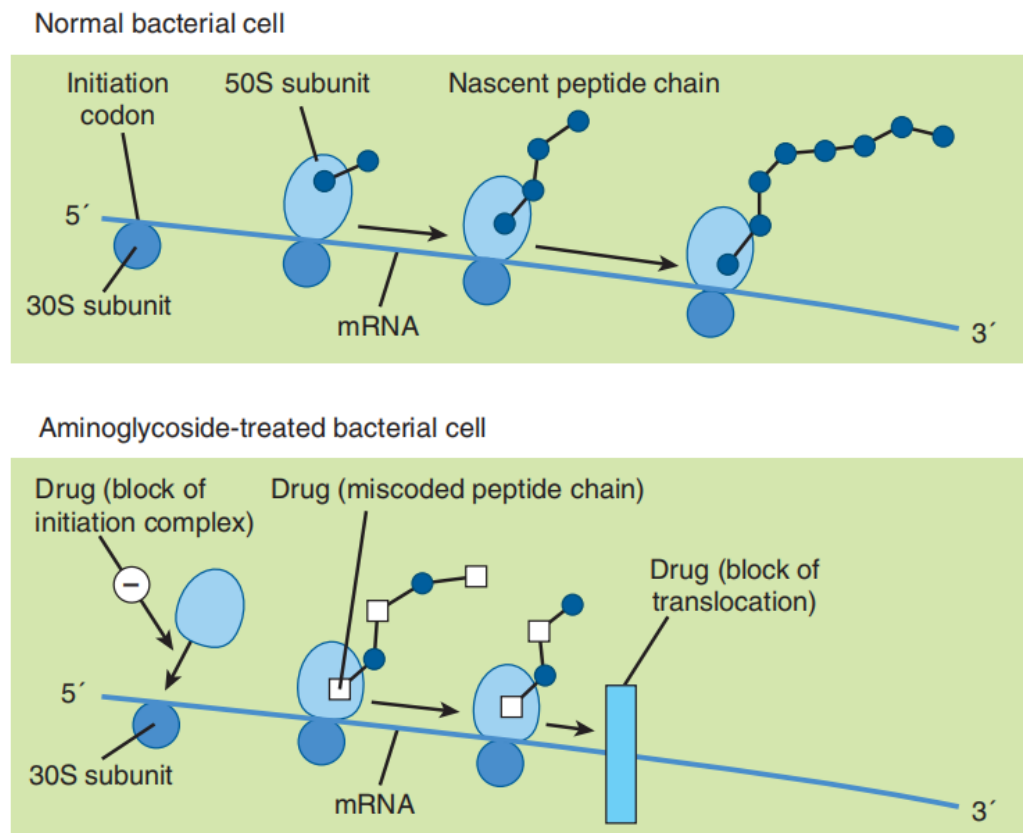


Рисунок 2.3 Можливі механізми дії аміноглікозидів на бактерії. Нормальний синтез білка показано у верхній частині. У нижній частині зображено шляхи дії аміноглікозиду[17].

Усередині клітини аміноглікозиди зв'язуються зі специфічними 30S-субодиницями рибосомних білків. Синтез білка пригнічується аміноглікозидами щонайменше трьома способами: (1) втручання в комплекс ініціації утворення пептидів; (2) неправильне зчитування мРНК, що призводить до включення неправильних амінокислот у пептид і призводить до утворення нефункціонального або токсичного білка; і (3) розпад полісом на нефункціональні моносоми. Ці дії відбуваються більш-менш одночасно, і загальний ефект є незворотнім і летальним для клітини[17].

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Micromonospora spp. широко розповсюджені в різноманітних середовищах, включаючи ґрунт, морські відкладення, гірські породи, азотфіксуючі бульбочки бобових та актиноризних рослин, та прісноводні відкладення. Повний геном було вивчено у *Micromonospora* sp. штаму B006, який було виділено з донних відкладів озера Мічиган. Особливості геному даного штаму наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. особливості геному *Micromonospora* sp. B006[18].

Кількість пар нуклеотидів	7040153
Вміст Г+Ц (%)	72,8
Гени, що кодують білки	6251
Гени рРНК	9
5S рРНК	3

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Арк-ш	Арк-шів
Розроб.		Головач О.О.					27	79
Конс.						КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Піць В.В.						
Затверд.								

Продовження табл. 3.1

16S рРНК	3
23S рРНК	3
Гени тРНК	52

Також було створено хромосомну карту даного штаму (рис. 3.1). Смуга 1 (зовні всередину) показує розподіл кластерів біосинтетичних генів (БГК). Відомі БГК показані червоним кольором, тоді як синім кольором показані "сирітські" БГК. Смуги 2 і 3 показують передбачувані відкриті рамки зчитування на провідному (чорний) та відстаючому (сірий) ланцюгах, відповідно. На смугах 4 і 5 зображено

нормалізований графік гуанозин+цитозин (жовтий/фіолетовий) та нормалізований графік співвідношення Г+Ц (чорний/сірий), відповідно.

Зовнішнє коло показує розмір у парах основ. Карту згенеровано за допомогою програми DNAPlotter.25[18].

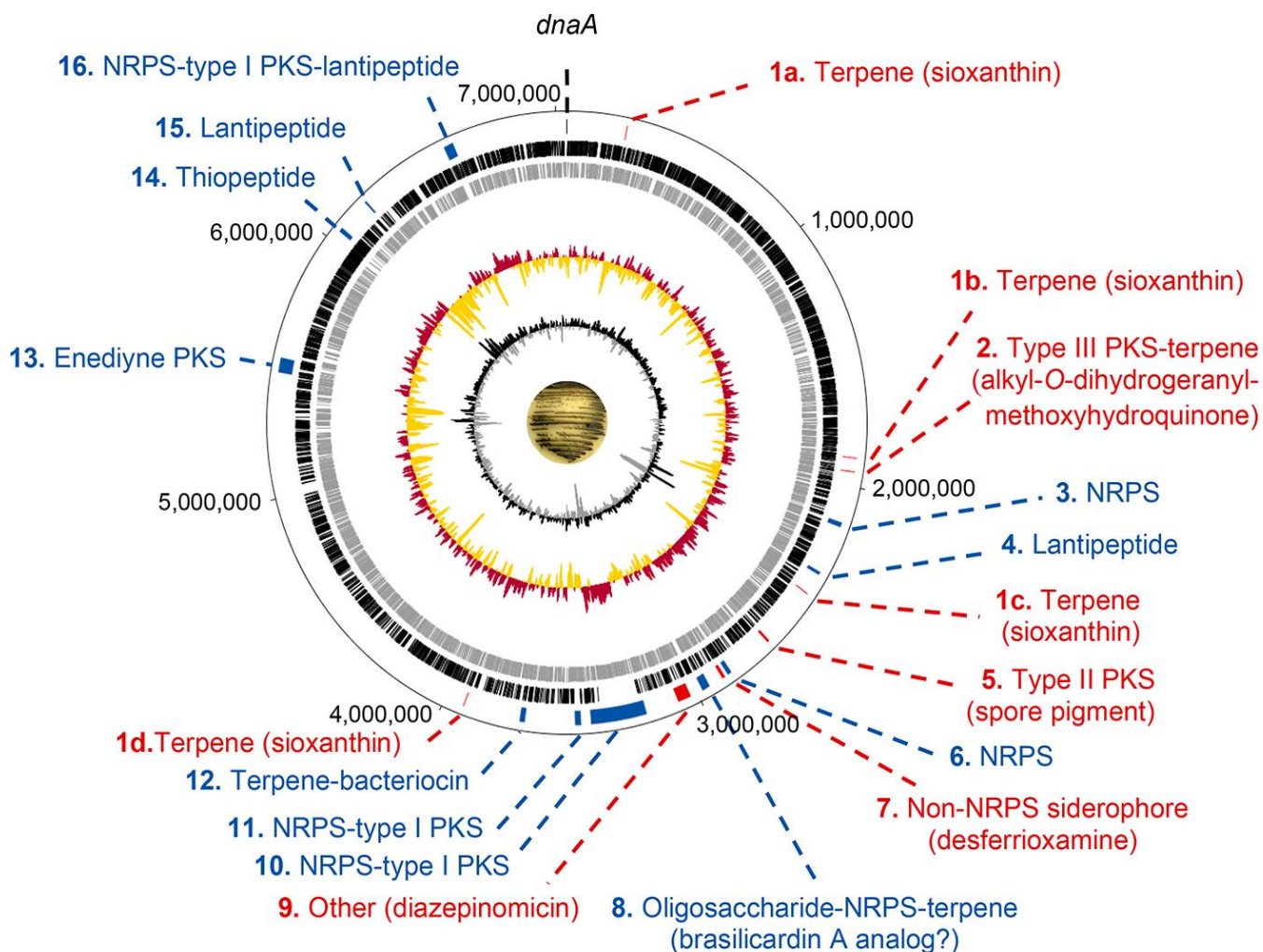


Рисунок 3.1 Хромосомна карта *Micromonospora* sp. B006[18].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Індукований мутагенез

Мутаген етилметансульфонат використовується для отримання гентаміцинових мутантів, стійких до стресу (1000 мкг/мл гентаміцину). Результати показали, що цей мутант дає 25 мм зонного інгібування при використанні *B. subtilis* як тестового штаму з 178,57% у порівнянні з батьківським штамом. Зона інгібування 25 мм мутанта М40-12 дорівнює 1500 мкг/мл за стандартною кривою гентаміцину; тоді як батьківський штам продукував 800 мкг/мл гентаміцину. Так, покращення гентаміцину після EMS-мутагенезу досягнуто в 1,9 раза.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Крім того, використовується апарат полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення варіабельності між кращими гентаміциновими мутантами порівняно з батьківським штамом за допомогою чотирьох випадкових праймерів. Результати дослідження показали різні відбитки пальців за допомогою ПЛР-аналізу випадкової ампліфікованої поліморфної ДНК. Також філогенетичний аналіз був застосований для поділу досліджуваних мутантів на кластери, які могли б відображати генетичне різноманіття нових кращих гентаміцинових мутантів[19].

Також було досліджено, що коефіцієнт секреції гентаміцину збільшується до 22,7% шляхом застосування багаторазової мікрохвильових обробок інтенсивністю 127,5 Вт протягом 40 с з інтервалом 12 год. Виявлено, що теплова обробка підвищує рівень культивованості спорової популяції, тобто більшість спор перебувала в стані спокою і тому потребує певної активаційної обробки, щоб ініціювати проростання.

Обробка тепловим шоком здійснювалась при різних температурах (40, 45 і 50°C протягом 1 хв) на водяній бані та в мікрохвильовій печі. Максимальна концентрація гентаміцину, 983 мг/мл, спостерігалася в культурі, обробленій при 40°C в мікрохвильовій печі. У культурах, оброблених на водяній бані максимальна продукція 972 мг/л спостерігалася при 45°C. Обробка при 40°C на водяній бані та 45°C в мікрохвильовій печі також сприяла збільшенню продукування гентаміцину порівняно з контрольними культурами (924 і 917 мг/л відповідно). Температура 50°C пригнічувала продукування гентаміцину як на водяній бані, так і в мікрохвильовій печі[20].

Ще одним фактором впливу на синтез гентаміцину є збільшення вмісту солі. Різні концентрації NaCl (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1%) додавали у поживне середовище під час ферментації на 0, 24, 48 і 72 години. Виробництво гентаміцину збільшилося до 1029 і 1043 мг/л при додаванні 0,2 і 0,4% NaCl, відповідно, порівняно з 882 мг/л, виробленим вихідним штамом. Продукування

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						30
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

гентаміцину було максимальним (1115 мг/л) при додаванні 0,6% NaCl через 48 годин, тобто вихід гентаміцину збільшився в 1,26 рази[20].

Також вивчено вплив етанолу на продукування гентаміцину у штамів роду *Micromonospora*. Різні концентрації (1-6%) етанолу додавали в колби для струшування на 0, 24, 48 і 72 годин ферментації. Синтез гентаміцину був найвищим (1096 мг/мл) при додаванні 4% етанолу на 24 год. Також, виробництво гентаміцину було покращено в середовищі з додаванням 2% (979 мг/л) та 3% (1052 мг/л) етанолу. Етанол мав негативний вплив на продукування гентаміцину в концентраціях 5 та 6%. Проте варто зауважити, що додавання етанолу пригнічувало ріст штаму[20].

Наступним фактором індукованого мутагенезу, який було розглянуто – це вплив ультрафіолетового випромінювання. 10 мл суспензії міцелію, взятої в асептичну пластину без кришки, опромінювали УФ-світлом протягом 10, 20 і 30 хв на відстані 30 см від УФ-лампи з довжиною хвилі 253,7 нм і потужністю 30 Вт. Пеніцилін (50 мг/мл) та канаміцин (50 мг/мл) використовували як скринінгові агенти для отримання резистентних мутантів. Клітинну суспензію вихідного штаму після індукції мутацій вносили на середовище, що містило один з вищезазначених агентів і проводили скринінг стійких мутантів. Результати даного дослідження представлено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2. Вплив ультрафіолетового випромінювання на синтез гентаміцину[20].

Назва мутантного штаму	Час експозиції (хв)	Антибіотик, що використовувався для селекції	Вихід гентаміцину (мг/л)	Біомаса (г/л)
УФ-3	10	Пеніцилін	987	7,9
УФ-6	20	Пеніцилін	1146	7,2
УФ-9	20	Канаміцин	1025	7,5

Продовження табл. 3.2

УФ-14	20	Пеніцилін	1048	6,9
УФ-17	20	Пеніцилін	1269	8,0
УФ-20	30	Канаміцин	1114	7,6
УФ-21	30	Пеніцилін	1302	7,5

Методи генної та клітинної інженерії

Гентаміцин С2 отримують шляхом метилювання С-6' пурпурозаміну, тоді як гентаміцин С1 утворюється шляхом подальшого метилювання С-6' аміногрупи гентаміцину С2. Тому було досліджено ген *genL* у *M.purpurea* на наявність аденозил метіонін-зв'язуючого демена. Ферменти, що містять цей домен можуть метилювати різні субстрати. Для перевірки функції гена *genL* у *M. purpurea* та отримання штаму-продуцента С1а, плазмиду порушення *pKTL12* (що видаляє *genL*) індивідуально вводили в *M. purpurea* GbK1101 (*genK*) за допомогою кон'югаційного переносу (рис. 3.2). Ампліфікований продукт подвійного кросинговеру мутанта порівнювали з ПЛР-продуктом дикого типу та одинарного кросоверного мутанта [12].

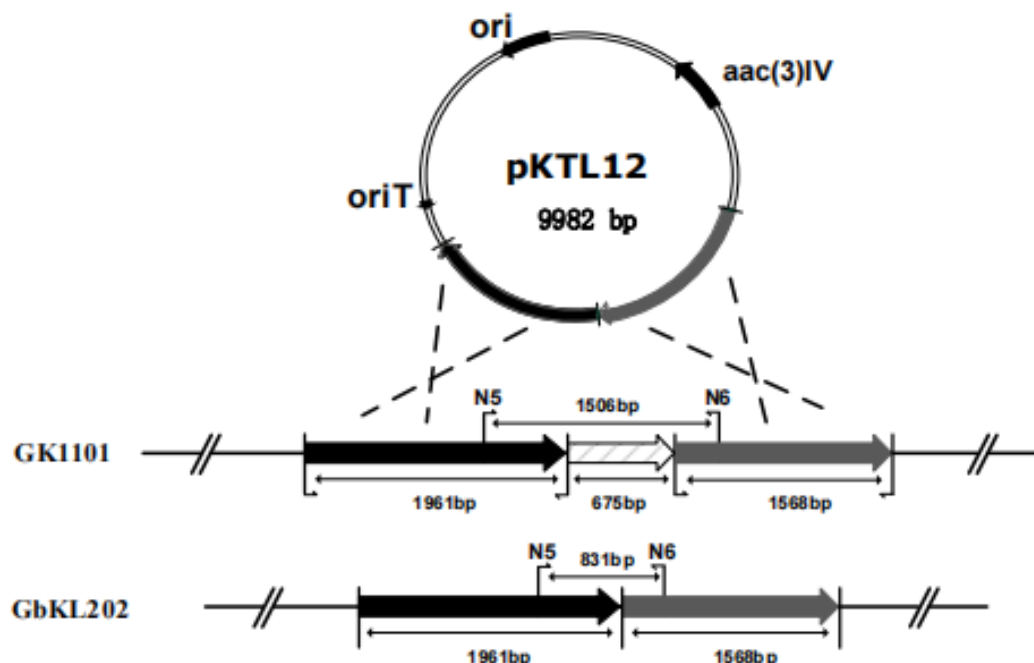


Рисунок 3.2 Порухення цільового гена в *M. purpurea* GK1101. Схема, що показує ділянку цільового гена в GK1101 (вихідний штам) та GbKL202 (інженерний штам)[12].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Схему отримання високопродуктивного штаму зображено на рисунку 3.3.

Культивування штаму проводиться при наступних умовах: температура 30°C, рН = 7,0, час – 7 діб.

Для отримання високопродуктивного штаму було обрано індукований мутагенез, а саме вплив ультрафіолетового світла протягом 20 хвилин на відстані 30 см від УФ-лампи з довжиною хвилі 253,7 нм і потужністю 30 Вт, ступінь летальності 99%.

Колонії, котрі вижили, переносяться на агарний блок, а потім на ідентифікаційна таблицю на 16-20 годин. При цьому спостерігаються зони гальмування та відбираються штами більшого діаметру.

Після мутагенезу колонії повторно висіюються на середовище, що містить скринінговий агент – пеніцилін, після чого відбувається відбір колоній та одержання високопродуктивного промислового штаму.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

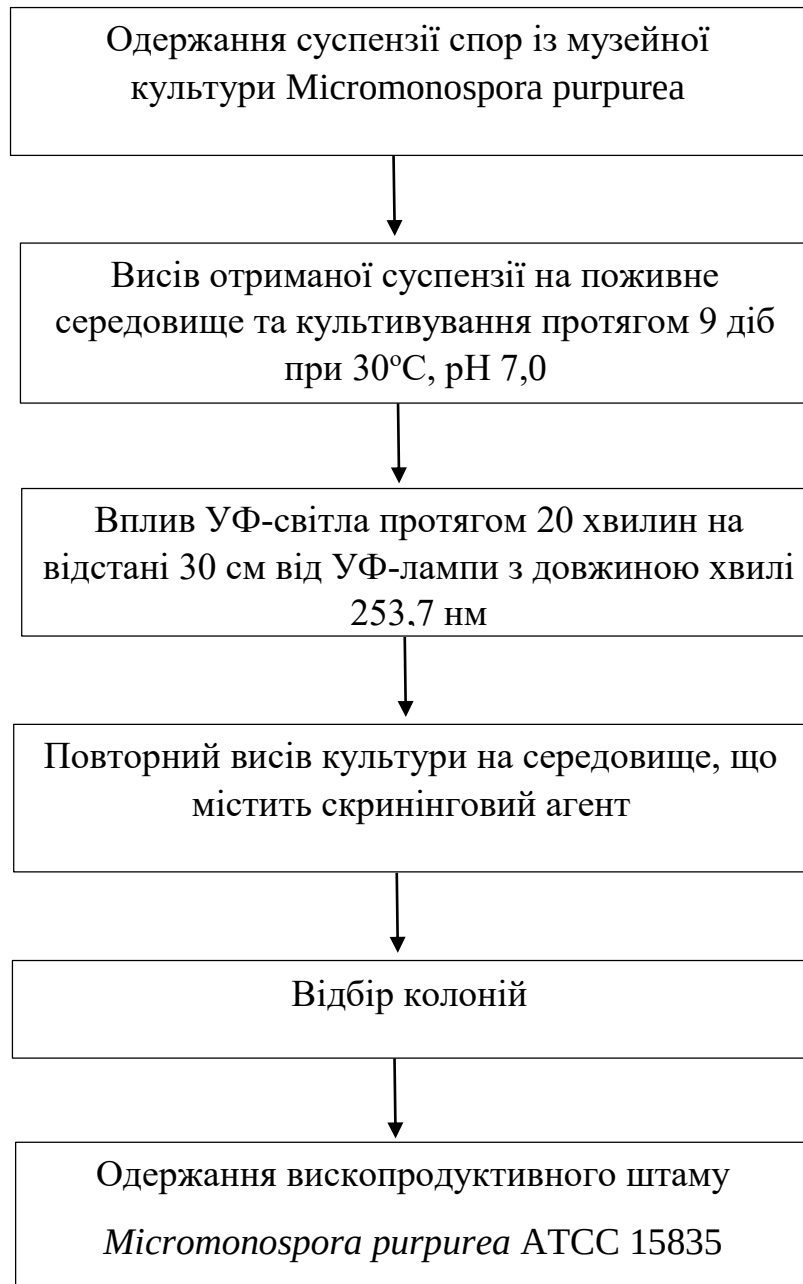


Рисунок 3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва препарату: гентаміцин порошок для ветеринарного застосування.

Діючий нормативно-технічний документ на продукцію: Правила належної виробничої практики ветеринарних препаратів: затв. наказом міністерства аграрної політики та продовольства України від 10.11.2017 № 606.

Реєстраційне свідоцтво в Україні АВ-05151-01-14.

Порошок гентаміцину для зовнішнього застосування використовується для лікування та профілактики інфекційних захворювань у тварин. Основні призначення включають:

- Лікування ран і порізів: Гентаміцин в порошковій формі може бути нанесений безпосередньо на рани тварин, що допомагає уникнути або лікувати інфекційні ускладнення. Він проявляє бактерицидну активність проти широкого спектру грам-позитивних і грам-негативних бактерій.
- Лікування запальних шкірних захворювань: Гентаміцин може бути використаний для лікування шкірних захворювань, таких як дерматити, гнійні вузли, екземи та інші запальні процеси. Він має протизапальну та антибактеріальну дію, що допомагає знизити запалення та контролювати розмноження бактерій.
- Профілактика інфекцій: Порошок гентаміцину може використовуватись для профілактики інфекційних захворювань у тварин, особливо в умовах, де існує високий ризик інфекції. Він може бути використаний для обробки ран, знеболення місцевої імунітету та запобігання розмноженню патогенних мікроорганізмів.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркцш	Аркцшів
Розроб.		Головач О.О.					35	79
Конс.						КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Піць В.В.						
Затверд.								

- Лікування дерматологічних інфекцій: Гентаміцин може бути використаний для лікування дерматологічних інфекцій у тварин, таких як піодермія, гнійні дерматити, фолікуліти та інші шкірні захворювання, які спричинені бактеріальною інфекцією. Застосування порошку гентаміцину на пошкоджені ділянки шкіри допомагає знизити запалення, покращити заживлення та знищити патогенні бактерії.
- Профілактика післяопераційних інфекцій: Гентаміцин може бути використаний для профілактики післяопераційних інфекцій у тварин. Після хірургічних втручань порошок гентаміцину може бути застосований на операційну рану для запобігання розмноженню бактерій та розвитку інфекції.

Готовий препарат – це аморфний порошок білого або білого зі світло-жовтим відтінком кольору, без запаху.

Форма випуску: пластикові флакони по 2г або 5г, по 1 флакону у пачці.

Умови зберігання: Сухе, захищене від світла, недоступне для дітей місце за температури від 8° С до 15° С, окремо від харчових продуктів та кормів для тварин[1].

Термін придатності 4 роки.

Пакування та маркування готового препарату гентаміцину здійснюється відповідно до ДСТУ ISO 15378:2019, а подальше транспортування відбувається згідно СТ-Н МОЗУ 42-5.1:2011.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						36
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів.

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 L-триптофан	ДФУ 2001	Вміст (S)-2-аміно-3-(1H-індол-3-іл)пропанової кислоти 98,5%-101,0%	Компонент кінцевої продукції
1.2 Глюкоза	ДСТУ 4464:2005.	Масова частка вологи не більше 9%	Компонент ПС
1.3 Дріжджовий екстракт	ТУ 9385-007-39484474-2003	Вміст дріжджів не більше 10 КУО/г	Компонент ПС
1.4 Кальцію карбонат	ДСТУ 4530-76	Вміст кальцію карбонату понад 97%	Компонент ПС
1.5 Крохмаль картопляний	ДСТУ 4286:2004	Вміст вологи 17%-20% Кислотність не більше 7,5	Компонент ПС

Продовження табл. 4.1

1.6 Магнію сульфат	ДСТУ 4523-77	Вміст магнію 17% Вміст сірки 13%	Компонент ПС
1.7 Метоксан	ТУ У 21.1-24376264-001:2011	Вміст метоксану 99,0%-102,0%	Компонент кінцевої продукції
1.8 Музейна культура <i>Micromonospora purpurea</i> ATCC 15835	-	Мікробіологічна чистота	Для отримання посівного матеріалу
1.9 Піногасник синтетичний	ДСТУ EN 12728:2008	Вміст діючої речовини не менше 98%	Компонент ПС
1.10 Соєве борошно	ДСТУ 4543:2006	Масова частка вологи не більше 9%	Компонент ПС
1.11 Триптон	ДСТУ 1040:2004	Вміст вологи не більше 10%	Компонент ПС
1.12 Хлорид кобальту	ДСТУ ISO 6353-1:2012	Вміст кобальту 0,001 г/см ³	Компонент ПС
1.13 Цинку сульфат гептагідрат	ДСТУ 4174-77	Вміст цинку сульфату гептагідрату 99,0%-104,0%	Компонент кінцевої продукції
1.14 Яловичий екстракт	ДСТУ 4670:2006.	Вміст білку 90%	Компонент ПС
2. Допоміжна сировина			

Продовження табл. 4.1

2.1 NaOH	ДСТУ ISO 3196:2001	Вміст натрій гідроксиду не менше 99%	Регулятор pH
2.2 Амоній гідроксид	ДСТУ 7274:2012	Вміст амоній гідроксиду 25%	Регулятор pH
2.3 Вода очищена	ДСТУ 7525:2014	Мікробіологічна чистота	Для миття устаткування
2.4 Засіб синтетичний миючий	ДСТУ 2207.1-93	Вміст активного хлору 3%	Для миття устаткування
2.5 Сульфатна кислота	ДСТУ 2184:2018	Вміст сульфатної кислоти не менше 99,5%	Регулятор pH
3. Матеріали			
3.1 Картон пакувальний	ДСТУ 8401:2015	Цілісність	Пакування готової продукції
3.2 Пластикові флакони	ДСТУ EN ISO 8362-4:2019	Цілісність	Пакування готової продукції
3.3 Поліетилен пакувальний	ДСТУ 7275:2012	Цілісність	Пакування готової продукції
3.4 Поліетиленова стрічка	ДСТУ ISO 780- 2001	Маркування	Пакування готової продукції
4. Напівпродукти			

Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата

ДП БТ9108.00.000 ПЗ

Арк.

39

Продовження табл. 4.1

4.1 Порошок гентаміцин сульфату	ДФУ 2001	Антимікробна активність не менше 590 ОД/мг	Компонент кінцевої продукції
4.2 Посівний матеріал	Згідно виробничого регламенту	Мікробіологічна чистота	Для подальшого культивування

4.3 Опис технологічного процесу

Технологія отримання антибіотику Гентаміцин у вигляді порошку має наступні стадії: підготовка поживних середовищ, підготовка посівного матеріалу, культивування, виділення, очищення та сушіння гентаміцину та змішування усіх компонентів препарату.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Працівники мають пройти відповідне навчання та зробити медичний огляд. Робітники повинні проходити повне санітарно-медичне обстеження раз на рік, а також прослухати інструктаж щодо санітарно-гігієнічних умов праці.

ДР 1.2 Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

Важливим етапом перед початком виробництва є обробка відповідними дезінфікуючими та мийними засобами обладнання та комунікацій згідно вимог GMP. Це робиться задля запобігання потрапляння контамінантів у готову продукцію.

У виробництві використовується саме синтетичний мийний засіб, тому що він є не токсичним, має економний розхід, що відповідно зменшить витрати підприємства. Для приготування необхідно змішати 10 л води температурою 40-50°C та 50 г синтетичного мийного засобу. Необхідні об'єми вимірюються за допомогою об'ємно-вагових дозаторів Д-1 та Д-2, а саме змішування проходить у реакторі-змішувачі Р-3.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Як дезінфекційний розчин використовується 5% розчин Хлораміну Б. Для його приготування необхідно змішати 10 л води температурою 40-50°C та 500 г безпосередньо Хлораміну Б.

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень здійснюється наступним чином: спочатку робиться вологе прибирання серветкою, що змочена у розчині синтетичного мийного засобу. Обов'язково після цього залишки мийного засобу змиваються водою.

Наступним етапом проводиться дезінфекція, заздалегідь приготованим, розчином Хлораміну Б. Після цього поверхні знову промиваються водою.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1 Мийка вузлів обладнання

Першим етапом проводиться миття обладнання за допомогою автоматизованої мийки, в яку заливається раніше підготовлений мийний засіб. При цьому всі з'ємні частини миються вручну із використанням синтетичного мийного засобу.

Повторюється мийка після кожного виробничого циклу.

ДР 1.4.2 Дезінфекція обладнання та комунікацій

Дезінфекція проводиться із використанням розчину Хлораміну Б. на цьому етапі також відбувається зняття з'ємних деталей та обробка їх вручну.

Дезінфекція проводиться після кожного виробничого циклу.

ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання та комунікацій

Стерилізація проводиться за допомогою водяної пари, температура якої 135-140°C. Процес відбувається при тиску 0,3 МПа протягом 1 год.

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 2.1 Забір повітря

Забір повітря здійснюється через забірний пристрій ЗП-4 на висоті 8-10 м у найбільш чистому місці.

					<i>ДП БТ9108.00.000 ПЗ</i>	Арк.
						41
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ДР 2.2 Механічна очистка повітря

Повітря подається на фільтр Ф-6, де відбувається механічна очистка. Вона є попередньою та дозволяє видалити забруднення діаметром 5-10 мкм. Таким чином відбувається очистка повітря від пилу, крапель води та деяких мікроорганізмів.

Механічна очистка здійснюється через решітку у трубопроводі.

ДР 2.3 Нагнітання повітря

Нагнітання повітря відбувається за допомогою вентилятора В-6. В ньому відбувається стиснення повітря до тиску 0,2 МПа. За рахунок цього повітря нагрівається до температури близько 100°C.

Після повітря подається на нагрівальну колонку НК-7

ДР 2.4 Кондиціонування та стабілізація параметрів

Після нагнітання повітря необхідно стабілізувати для того аби створити оптимальні умови культивування. Для цього повітря охолоджується до 25°C за допомогою теплообмінника, а також досягається оптимальна вологість – 40-60%.

Також здійснюється очистка від дрібних контамінантів, що залишились після механічної очистки: мікроорганізмів, частинок пилу.

ДР 3. Підготовка стерильного повітря

ДР 3.1 Забір повітря

Забір повітря здійснюється через забірний пристрій ЗП-9 на висоті 8-10 м у найбільш чистому місці.

ДР 3.2 Механічна очистка повітря

Механічна очистка є попередньою та здійснюється безпосередньо у трубопроводі за допомогою фільтра Ф-10. Ця очистка дозволяє видалити частки розміром не менше 5 мкм, що дозволяє позбутися пилу, крапель вологи та частки мікроорганізмів.

ДР 3.3 Нагнітання повітря

					<i>ДП БТ9108.00.000 ПЗ</i>	Арк.
						42
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ док-м.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Нагнітання повітря відбувається за допомогою вентилятора В-11. В ньому відбувається стиснення повітря до тиску 0,2 МПа. За рахунок цього повітря нагрівається до температури 100-120°C. Тому після цього повітря необхідно стабілізувати до досягнення оптимальних умов культивування.

ДР 3.4 Стабілізація термодинамічних показників

При стабілізації у теплообміннику ТО-12 фізико-хімічні показники необхідно довести до наступних показників: температура 25°C, вологість 40-60%.

ДР 3.5 Очищення на головному фільтрі

Стабілізоване повітря надходить до головного фільтра, у якому забезпечується ступінь очистки 95%.

ДР 3.6 Очищення на індивідуальному фільтрі

Очищення на індивідуальному фільтрі Ф-15 забезпечує ступінь очищення 99,9%. Діаметр пор фільтра складає 0,22 мкм.

ДР 4. Підготовка робочих розчинів

ДР 4.1 Приготування розчину натрій гідроксиду

У виробництві використовується 10% розчин натрій гідроксиду. Для приготування 10 л необхідного розчину до змішувача Р-18 за допомогою об'ємно-вагових дозаторів Д-16 та Д-17 подається 0,85 кг натрій гідроксиду та 9,15 л води.

Отриманий розчин натрій гідроксиду необхідно стерилізувати втому самому реакторі Р-18 протягом 30 хвилин при 120°C.

Подальше подавання розчину до труб відбувається за допомогою насосу Н-19.

ДР 4.2 Приготування розчину сульфатної кислоти

Для приготування 10 літрів 20% розчину сульфатної кислоти у змішувач Р-22 наливається 1,2 л концентрованої сульфатної кислоти та 8,8 л води. Дозування відбувається за допомогою об'ємно-вагових дозаторів Д-20 та Д-21.

Для подачі готового розчину у труби використовується насос Н-23.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						43
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 5. Підготовка поживного середовища для отримання посівного матеріалу

ДР 5.1 Приготування та стерилізація термолабільних компонентів

До термолабільних компонентів поживного середовища відносяться яловичий та дріжджовий екстракти, крохмаль, триптон. Необхідна кількість компонентів передається за допомогою дозатору Д-24. Змішування проходить у реакторі Р-25. Для стерилізації компоненти необхідно розігріти в автоклаві Ав-26 до 80°C з додаванням води, після чого вони нагріваються до 120°C глухим паром та витримуються 2 хв. В кінці компоненти охолоджуються до 25-30°C.

ДР 5.2 Приготування та стерилізація термостабільних компонентів

Всі інші компоненти поживного середовища, а саме глюкоза та крейда є термостабільними. Вони подаються за допомогою дозатора Д-27 та змішуються у реакторі Р-28 та стерилізуються 40 хв. при 120°C. Після цього компоненти охолоджуються до 25-30°C.

ДР 5.3 Змішування компонентів поживного середовища

Всі компоненти змішуються у відповідних пропорціях у змішувачі Р-29, після чого температура поживного середовища знижується до 30°C.

рН доводиться до позначки 7,0 за допомогою 10% гідроксиду натрію.

Також проводиться мікробіологічний контроль чистоти.

ДР 6. Підготовка поживного середовища для біосинтезу

ДР 6.1 Приготування та стерилізація термолабільних компонентів

До термолабільних компонентів поживного середовища для біосинтезу відносяться крохмаль та соєве борошно. Вони подаються за допомогою дозатору Д-33 в змішувач Р-32. Для стерилізації їх необхідно розігріти до 80°C з додаванням води, після чого компоненти нагрівають до 120°C глухим паром та витримують 2 хв. В кінці вони охолоджуються до 25-30°C.

ДР 6.2 Приготування та стерилізація термостабільних компонентів

Склад поживного середовища для біосинтезу:

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		

- Крохмаль картопляний
- Соеве борошно
- Магній сульфат
- Хлорид кобальту
- Піногасник синтетичний
- Крейда
- Вода

Термостабільні компоненти поживного середовища, окрім піногасника, подаються у змішувач Р-31 за допомогою дозатора Д-30 тастерилізуються протягом 1 год при 140°C. Вони засипаються при постійному помішуванні у воду, нагріту до 40°C. Отримана суспензія нагрівається ще до 80°C та витримується при такій температурі протягом 30 хв.

В кінці температура компонентів знижується до 25-30°C.

ДР 6.3 Змішування компонентів поживного середовища

Всі компоненти змішуються у відповідних пропорціях, після чого температура поживного середовища знижується до 30°C з використанням теплообмінників ТО-34, ТО-35, ТО-36.

рН доводиться до позначки 7,0 за допомогою 10% гідроксиду натрію.

Також проводиться мікробіологічний контроль чистоти.

ДР 7. Підготовка посівного матеріалу

ДР 7.1 Вирощування культури в колбах на качалках

Музейна культура *Micromonospora purpurea* ATCC 15835, що була попередньо відновлена, вноситься в колби Ерленмайера К-40 місткістю 750 мл з 50-100 мл рідкого живильного середовища.

Після цього колби з культурою поміщаються на качалки Т-41 з частотою обертання 175 об/хв. тривалість вирощування 72 год, при температурі 30°C.

ДР 7.2 Вирощування посівного матеріалу в інокуляті

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

Після закінчення інкубування в термостаті посівний матеріал перекачується у інокулятор ПФ-44 із простерелізованим поживним середовищем.

Вирощування відбувається протягом 4 доби при температурі 30°C.

Частота обертання мішалки інокулятора 175 об/хв, а також інокулятор оснащений барботером для забезпечення аерації технологічним повітрям у кількості 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища.

Отриманий посівний матеріал стерильно передається в основні ферментери.

ТП 8. Виробниче культивування

Культивування відбувається у ферментері Фв-48 місткістю 5,0 м³. До нього подається посівний матеріал у кількості 5%, що контролюється об'ємно-ваговим дозатором Д-45.

Ферментер забезпечує необхідні умови культивування. Для цього в ньому наявні необхідні комунікації, теплообмінники, штуцери для подачі поживного середовища, розчинів кислот і лугів. Така система забезпечує стабільну температуру 32°C та рН 7,0. Культивування відбувається протягом 96 годин.

Для підтримання масообмінних та енергообмінних процесів у ферментері наявна мішалка, що обертається із частотою 3,33 с⁻¹.

ТП 9. Фільтрування культуральної рідини

ТП 9.1 Попередня обробка культуральної рідини

Після етапу культивування культуральна рідина подається до реактору Р-49 та обробляється розчином сульфатної кислоти при температурі $t=33^{\circ}\text{C}$ та тиску $P=0,2\text{ МПа}$, утворений розчин має рН 2,0.

Дана обробка робиться для коагуляції білків та видалення полівалентних металів.

Подальше транспортування культуральної рідини здійснюється за допомогою насоса Н-50.

ТП 9.2 Перший етап фільтрування

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						46
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Перший етап фільтрування здійснюється на барабанному вакуум-фільтрі Ф-51. Фільтрування відбувається під тиском $P=0,8\text{МПа}$, зі швидкістю обертання 2,6 об/хв. продуктивність апарату складає $6\text{ м}^3/\text{год}$.

Фільтрат подається у збірник Зб-52 та транспортується на наступний етап за допомогою насоса Н-53.

ТП 9.3 Другий етап фільтрування

На другому етапі відбувається ультрафільтрування культуральної рідини. На даній стадії проходить процес концентрації розчинів високомолекулярних сполук, включаючи гентаміцин, з одночасною очисткою їх від низькомолекулярних домішок шляхом пропускання розчину через мембрану.

Спочатку культуральна рідина на попередні фільтри Ф-54, а після цього безпосередньо на ультрафільтраційну установку Ф-55. Фільтрування відбувається при тиску $P=1,5\text{МПа}$.

Утворений фільтрат збирається у збірник Зб-61 та подається на наступний етап за допомогою насоса Н-56.

ТП 10. Очищення гентаміцину

ТП 10.1 Нейтралізація фільтрату

Перед безпосереднім очищення гентаміцину, попередньо отриманий фільтрат необхідно нейтралізувати. За допомогою розчину натрій гідроксиду, що подається дозатором Д-63, рН фільтрату доводиться до позначки 7,0.

ТП 10.2 Іонообмінна хроматографія

Нейтралізована рідина подається на іонообмінну колонку КІ-60 типу IRC-50. Дана колонка має наповнення іонообмінною смолою катіонітом КБ-2 в амонійній формі. Насос подає рідину знизу вгору, а гентаміцин сорбується на катіоніті.

ТП 10.3 Елюювання домішок та мінорних сполук

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

Елюювання домішок та мінорних сполук відбувається шляхом пропускання розчину аміаку через шар катіоніта в іонообмінній колонці КІ-60 зверху вниз.

ТП 10.4 Виділення гентаміцину

Для виділення гентаміцину використовується 5%-ий розчин аміаку, що пропускається через іонообмінну колонку з катіонітом. Рух розчину зверху вниз.

ТП 11. Концентрування розчину гентаміцину

Розчин гентаміцину подається на роторний випарювач Ав-61 з метою концентрування розчину до вмісту гентаміцину 60 г/л. даний етап відбувається при температурі $t=50^{\circ}\text{C}$, $P=0,09\text{МПа}$.

ТП 12. Переведення гентаміцину в сульфатну форму

До очищеного та концентрованого розчину гентаміцину додають розчин сульфатної кислоти, доводячи рН до мітки 6,0-6,5. Процес відбувається у змішувачі Р-64. Розчин нагрівають до 40°C та перемішують протягом 30хв.

Далі розчин подається за допомогою насосу Н-65.

ТП 13. Сушіння концентрату гентамін сульфату

Концентрований розчин гентаміцин сульфату подається на розпилювальну сушарку СШ-66, котра проводить сушіння в асептичних умовах. Сушильним агентом виступає очищене повітря.

Сушіння відбувається при температурі 180°C , протягом 2 хвилин. Отриманий порошок має вологість 6-8%.

ТП 14. Змішування компонентів препарату

До змішувача Р-67 подаються всі компоненти препарату, а саме: отриманий гентаміцин сульфат, L-триптофан, цинку сульфат гептагідрат та метоксан у відповідних концентраціях за допомогою дозатора Д-68.

Отримана суміш подвється на розвантажувальний циклон ЦР-69 для подальшого пакування.

ТП 15. Наповнення флаконів

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		

Препарат фасується у пластикові флакони по 2г. допустиме відхилення у масі складає 2%.

ПМВ 16. Пакування та маркування продукту

На наповнені флакони наноситься етикетка, що містить наступні дані:

- Найменування препарату
- Виробник, його адреса та товарний знак
- Термін зберігання
- Об'єм нетто
- Номер партії
- Дата виготовлення
- Призначення препарату
- Умови зберігання

Кожен флакон поміщається у картонну коробочку разом із інструкцією, що містить інформацію про продукт та його застосування. Далі коробки відправляються на склад для подальшої реалізації.

ЗВ 17. Знешкодження відходів та викидів

В результаті виробництва утворюються відходи та викиди, котрі необхідно знешкодити. Сюди відносяться відпрацьоване повітря, конденсат, рідкі відходи, культуральна рідина та браковані матеріали.

Усі рідкі відходи (мийні засоби, дезінфікуючі засоби, відпрацьована вода) попередньо нейтралізуються до рН 7,0 та зливаються у загальну каналізаційну систему.

Повітря очищується на механічному фільтрі з метою видалення контамінантів.

Культуральну рідину обробляють гострою парою, після чого розводять водою нейтралізують та зливають у каналізаційну систему.

Браковані матеріали (флакони, коробки, скло, гумові рукавички і тд) сортують та за можливості відправляють на переробку.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

4.4 Матеріальний баланс

Розрахунок матеріального балансу виконано для серії препарату 100 шт.
по 2г.

Таблиця 4.2 Матеріальний баланс

Використано				Отримано			
Назва	Кількість			Назва	Кількість		
сировини, матеріалів та напівпродукті в	кг	шт	л	кінцевого продукту або напівпродукту, відходів витрат	кг	шт	л
Стадія санітарної підготовки виробництва							
Синтетичний мийний засіб	0,1			Мийний засіб			20
Хлорамін Б	1			Дезінфікуючий засіб			21
Вода			40	Витрати			0,1
Всього	41,1			Всього	41,1		
Стадія підготовки посівного матеріалу							
Музейна культура <i>Micromonospora purpurea</i> ATCC 15835			8,75	Інокулят			171,5
Яловичий екстракт	0,49875			Витрати			3,5
Триптон	0,83125						

Продовження табл. 4.2

Дріжджовий екстракт	0,83125						
Крейда	0,665						
Глюкоза	0,16625						
Крохмаль	3,99						
Вода питна			159,267 5				
Всього	175			Всього	175		
Стадія біосинтезу							
Крохмаль картопляний	99,75			Культуральна рідина			3430
Соєве борошно	16,625			Витрати			70
Магній сульфат	1,6625						
Хлорид кобальту	0,1995						
Піногасник синтетичний	6,65						
Крейда	23,275						
Вода			3180,33 8				
Посівний матеріал			171,5				
Всього	3500			Всього	3500		
Стадія змішування компонентів готового продукту							

Продовження табл. 4.2

Гентаміцину сульфат	0,004896			Готового препарату	0,2		
L-триптофан	0,002856			Витрати	0,004		
Цинку сульфат гептагідрат	0,00204						
Метоксан	0,194208						
Всього	0,204			Всього	0,204		
Пакування, маркування готового продукту							
Пластикові флакони		100		Упаковані флакони		100	
Коробка пакувальна		100					
Інструкція		100					
Всього	300			Всього	100		

4.5 Контроль виробництва

На виробництві використовується постадійний контроль процесу, що забезпечує відповідність готової продукції вимогам нормативно-технічної документації. Основний перелік контрольних точок, що забезпечують хід певного технологічного процесу, наведений у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3 Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.1 Підготовка персоналу Км 1.1.1	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод визначення	1 раз на 2 тижні	Не більше 5 КУО
ДР 1.2 Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів Кт 1.2.1	Концентрація синтетичного мийного засобу	Фізичний метод визначення	Після приготування розчину	C = 0,5%
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Км 1.3.1	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод визначення	Після кожної операції	Клас Д: КУО<200
ДР 1.4.1 Мийка вузлів обладнання Кт 1.4.1.1	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	40-60°C
ДР 1.4.2	Температура	Термометр		55-65°C

Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата

ДП БТ9108.00.000 ПЗ

Арк.

53

Продовження табл. 4.3

Дезінфекція обладнання та комунікацій Кт 1.4.2.1 Км 1.4.2.2			Під час проходження процесу	
	Час	Годинник		1,5-2 год
	Мікробіоло- гічна чистота	Мікробіологічний метод аналізу		KУО<2
ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання та комунікацій Кт 1.4.3.1 Км 1.4.3.2	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	140°C
	Час	Годинник		1 год
	Тиск	Манометр		0,3 МПа
	Мікробіоло- гічна чистота	Мікробіологічний метод аналізу		KУО<2
ДР 2.1 Забір повітря Кт 2.1.1	Кількість частинок	Повітропропуск- на здатність	Після кожної операції	2000 частинок/ м ³
ДР 2.2. Механічна очистка повітря Кт 2.2.1	Кількість частинок	Ефективність очистки	Під час проходження процесу	E = 80%
ДР 2.3 Нагнітання повітря Кт 2.3.1	Тиск	Манометр	Під час проходження процесу	0,2 МПа

Продовження табл. 4.3

ДР 2.4 Кондиціонування та стабілізація параметрів Кт 2.4.1	Температура	Термометр	Після закінчення операції	20°C
	Вологість	Вологомір		40-60%
ДР 3.1 Забір повітря Кт 3.1.1	Кількість частинок	Повітропропускна здатність	Після кожної операції	2000 частинок/ м ³
ДР 3.2. Механічна очистка повітря Кт 3.2.1	Кількість частинок	Ефективність очистки	Під час проходження процесу	E = 80%
ДР 3.3 Нагнітання повітря Кт 3.3.1	Тиск	Манометр	Під час проходження процесу	0,2 МПа
ДР 3.4 Кондиціонування та стабілізація параметрів Кт 3.4.1	Температура	Термометр	Після закінчення операції	20°C
	Вологість	Вологомір		40-60%
ДР 3.5 Очищення на	Кількість частинок	Ефективність очистки	Під час проходження процесу	E=95%

Продовження табл. 4.3

головному фільтрі Кт 3.5.1				
ДР 3.6 Очищення на індивідуальн ому фільтрі Кт 3.6.1	Кількість частинок	Ефективність очистки	Під час проходження процесу	E=99,99%
	Мікробіоло- гічна чистота	Мікробіологічний метод аналізу		Відмут- ність мікроорга- нізмів
ДР 4.1 Приготуванн я розчину натрій гідроксиду Кх 4.1.1 Кт 4.1.2	Концентрація NaOH	Фізичний метод аналізу	Кожну операцію	10%
	Час	Годинник		30 хв
	Температура	Термометр		120°C
ДР 4.2 Приготуванн я розчину сульфатної кислоти Кх 4.2.1	Концентрація H ₂ SO ₄	Фізичний метод аналізу	Кожну операцію	20%

Продовження табл. 4.3

ДР 5.1 Приготування та стерилізація термолабільних компонентів Кт 5.1.1 Км 5.1.2	Вміст компонентів	Ваги	Під час проходження процесу	Відповідно до технології
	Час	Годинник		2 хв
	Температура	Термометр		120°C
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод визначення		Відсутність мікроорганізмів
ДР 5.2 Приготування та стерилізація термостабільних компонентів Кт 5.2.1 Км 5.2.2	Вміст компонентів	Об'ємно-ваговий дозатор	Під час проходження процесу	Відповідно до технології
	Час	Годинник		40 хв
	Температура	Термометр		120°C
	Тиск	Манометр		0,1МПа
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод визначення		Відсутність мікроорганізмів
ДР 5.3	Температура	Термометр		30°C

Продовження табл. 4.3

Змішування компонентів поживного середовища Кт 5.3.1	pH	Фізичний метод аналізу	Під проходження процесу	7,0
ДР 6.1 Приготування та стерилізація термолабільних компонентів Кт 6.1.1 Км 6.1.2	Вміст компонентів	Ваги	Під час проходження процесу	Відповідно до технології
	Час	Годинник		40 хв
	Температура	Термометр		120°C
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод визначення		Відсутність мікроорганізмів
ДР 6.2 Приготування та стерилізація термостабільних компонентів Кт 6.2.1 Км 6.2.2	Вміст компонентів	Об'ємно-ваговий дозатор	Під час проходження процесу	Відповідно до технології
	Час	Годинник		40 хв
	Температура	Термометр		120°C
	Тиск	Манометр		0,1МПа
	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний метод визначення		Відсутність мікроорганізмів
ДР 6.3 Змішування компонентів	Температура	Термометр	Під проходження процесу	30°C
	pH	Фізичний метод аналізу		7,0

Продовження табл. 4.3

поживного середовища Кт 5.3.1				
ДР 7.1 Вирощуванн я культури в колбах на качалках Кт 7.1.1 Км 7.1.2	Температура	Термометр	Під час проходження операції	30°C
	Час	Годинник		72 год
	Швидкість обертання мішалки	Фізичний метод аналізу		175 об/хв
	Мікробіологіч на чистота	Мікробіологічний метод аналізу		Відсутніст ь контамінан тів
ДР 7.2 Вирощуванн я посвіного матеріалу в інокуляторі Кт 7.2.1 Км 7.2.2	Температура	Термометр	Під час проходження операції	30°C
	Час	Годинник		72 год
	Швидкість обертання	Фізичний метод аналізу		175 об/хв
	pH	фізичний метод аналізу		7,0
	Мікробіологіч на чистота	Мікробіологічний метод аналізу		Відсутніст ь контамінан тів
ТП 8	Температура	Термометр		32°C
	Час	Годинник		96 год

Продовження табл. 4.3

Виробниче культивуван ня Кт 8.1.1 Км 8.1.2	Аерація	Фізичний метод аналізу	Під час проходження операції	1 м ³ /м ³
	pH	фізичний метод аналізу		7,0
	Мікробіологіч на чистота	Мікробіологічний метод аналізу		Відсутніст ь контамінан тів
ТП 9.1 Попередня обробка культуральн ої рідини Кт 9.1.1 Км 9.1.2	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	33°C
	Тиск	Манометр		0,2 МПа
	Мікробіологіч на чистота	Мікробіологічний метод аналізу		Відсутніст ь контамінан тів
ТП 9.2 Перший етап фільтруванн я Кт 9.2.1 Км 9.2.2	Тиск	Манометр	Під час проходження процесу	0,8 МПа
	Мікробіологіч на чистота	Мікробіологічний метод налізу		Відсутніст ь контамінан тів
ТП 9.3 Другий етап фільтруванн я	Тиск	Манометр	Під час проходження процесу	1,5 МПа
	Мікробіологіч на чистота	Мікробіологічний метод налізу		Відсутніст ь

Продовження табл. 4.3

Кт 9.3.1 Км 9.3.2				контамінан тів
ТП 10.1 Нейтралізаці я фільтрату Кт 10.1.1	pH	Фізичний метод аналізу	Під час проходження процесу	7,0
ТП 10.2 Іонообмінна хроматограф ія Кт 10.2.1	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	20°C
ТП 10.3 Елюювання домішок та мінорних сполук Кт 10.3.1	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	20°C
ТП 10.4 Виділення гентаміцину Кт 10.4.1	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	20°C
ТП 11 Концентрува ння розчину гентаміцину	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	50°C
	Тиск	Манометр		0,09 МПа

Продовження табл. 4.3

Кт 11.1	Концентрація	Фізичний метод аналізу		60 г/л
ТП 12 Переведення гентаміцину в сульфатну форму Кт 12.1	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	50°C
	Час	Годинник		30 хв
ТП 13 Сушіння концентрату гентаміцину сульфату Кт 13.1	Температура	Термометр	Під час проходження процесу	180°C
	Час	Годинник		2 хв
	Вологість	Вологомір		6-8%
ТП 14 Змішування компонентів препарату Кт 14.1	Вміст компонентів	Об'ємно-ваговий дозатор	Під проходження процесу	Згідно технології
ТП 15 Наповнення флаконів Кт 15.1	Вміст флакону	Об'ємно-ваговий дозатор	Під час проходження процесу	2 г

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Виробництво гентаміцину являє собою мікробіологічний синтез, тому підготовка посівного матеріалу є незамінним етапом технології. Для цієї стадії використовується інокулятор, що забезпечує підтримку необхідних умов культивування.

Типовий інокулятор представляє собою вертикальну ємність, що має номінальний об'єм 0,25 м³. Для забезпечення необхідного температурного та газового режиму, інокулятор оснащений сорочкою, мішалкою, барботером та відбійниками. Також апарат має штуцери для відводу та входу теплоносія, поживного середовища, посівної культури і т.д.

В даній технології виробництва продуцентом гентаміцину є *Micromonospora purpurea*. При підготовці посівного матеріалу культивування проводиться протягом 72 годин із наступними показниками: температура 30°C, рН 7,0, аерація 1м³/м³ середовища. До інокулятора подається поживне середовище такого складу: яловичий екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза, крохмаль, триптон, крейда та вода.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркцш	Аркцшів
Розроб.		Головач О.О.					63	79
Конс.		Шидецький В.Ю.				КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Піць В.В.						
Затверд.								

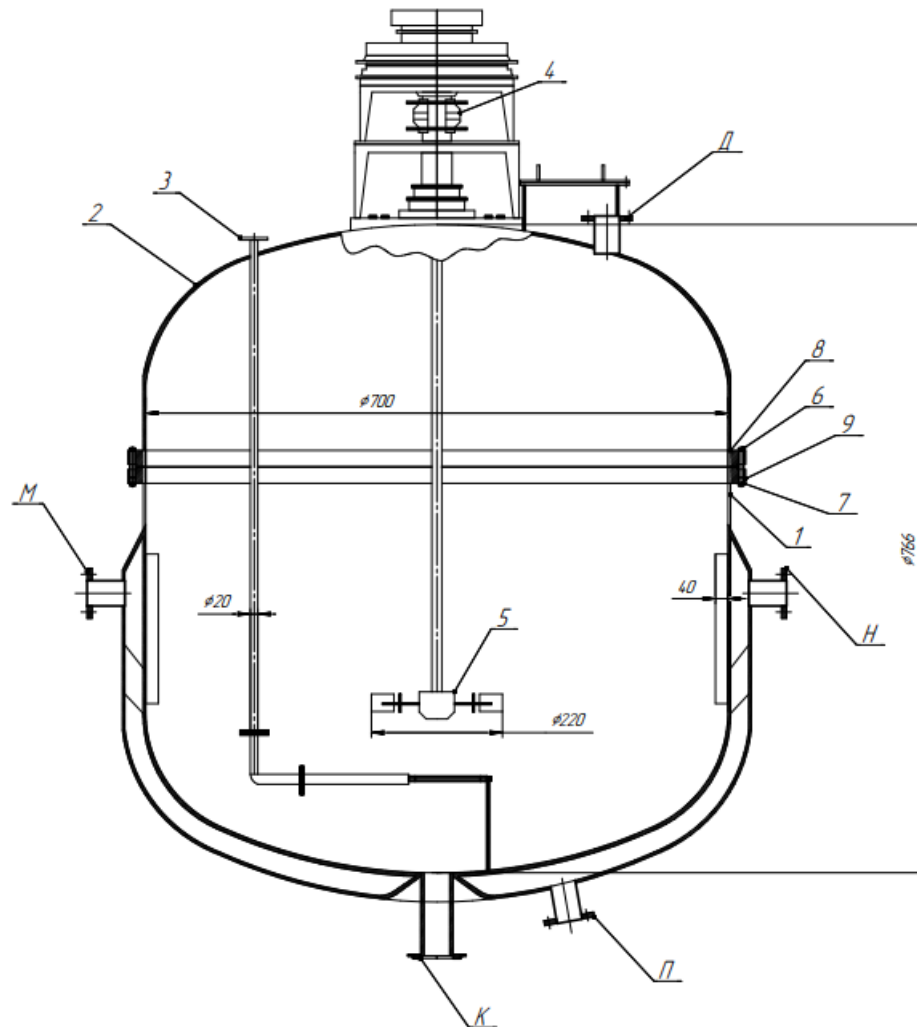


Рисунок 5.1 Принципова схема інокулятора[20].

1 – корпус, 2 – кришка, 3 – барботер, 4 – привод перемішуючого пристрою, 5 – перемішуючий пристрій, 6 – болт, 7 – гайка, 8 – прокладка, 9 – шайба.

Важливим конструктивним елементом інокулятора, що забезпечує масообмінні процеси, є мішалка. Їх існує декілька типів, кожен з яких має власні особливості та конкретні сфери використання.

Лопатева мішалка є найбільш простою. Вона представляє собою плоскі лопаті, котрі встановлені на валу під певним кутом. Окрім куту нахилу, мішалка може відрізнятися кількістю лопатей. Зазвичай даний тип перемішуючого пристрою використовується для малов'язких речовин. Також зазвичай їх встановлюють для розчинення або суспендування речовин.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

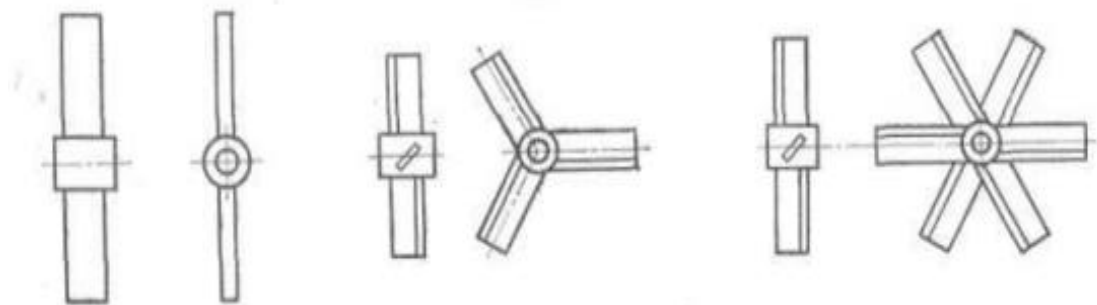


Рисунок 5.2 Лопатеві мішалки[20].

Однолопатева, трилопатева, шестилопатева мішалки.

Пропелерні мішалки застосовуються для перемішування помірно в'язких речовин. Відповідно до назви, перемішування здійснюється за допомогою пропелера, котрий насаджений на вісь. Вісь обертання може бути горизонтальною, вертикальною або похилою.

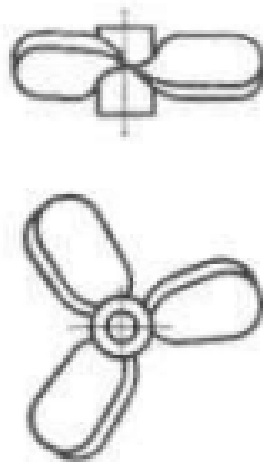


Рисунок 5.3 Пропелерна мішалка[20].

Турбінні мішалки є поширеним типом, що використовуються якщо необхідно створити інтенсивне перемішування. Це досягається завдяки турбінному колесу, яке обертається на вертикальній осі. Також турбінні мішалки поділяються на два типи: відкриті та закриті.

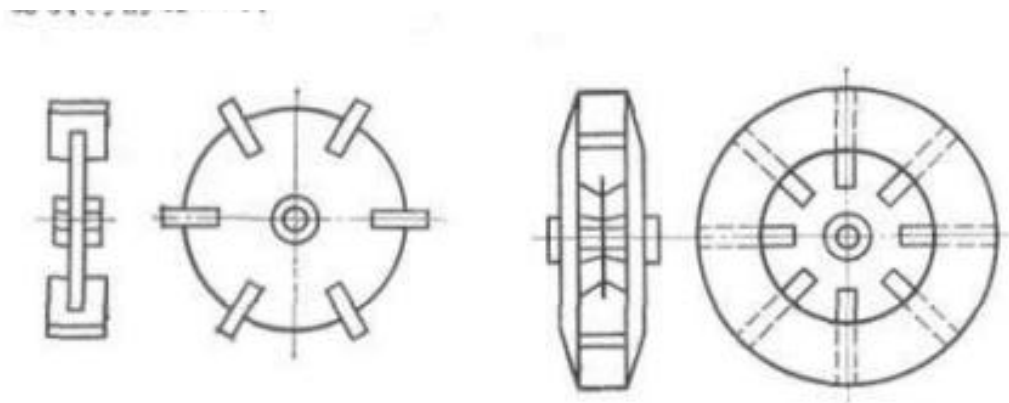


Рисунок 5.4 Турбінні мішалки[20].

Відкрита та закрыта турбінні мішалки.

В технології, що розглядається, необхідне перемішування становить 175 об/хв. Таку інтенсивність найліпше забезпечить турбінна відкрита мішалка.

Ще одним важливим елементом інокулятора є барботер. Його робота забезпечує аерацію середовища стерильним технологічним повітрям. В обраному апараті вмонтовано кільцевий безнапорний барботер, так як завдяки свої конструкції, а саме рівномірному розподілу отворів на поверхні, він забезпечує малий діаметр бульбашок, що забезпечує рівномірну та ефективну аерацію.

Наступним обраним елементом є ущільнення місця валу в порожнину інокулятора. Даний елемент забезпечує герметичність апарату. Враховуючи конструктивні параметри апарату та особливості виробництва, було обрано подвійне ущільнення з термічним затвором. Цей тип ущільнення призначений для апаратів зі стерильними біологічними процесами, а також використовується для валу діаметром 40-80 мм та температурою середовища від 10 до 140°C.

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

- Робочий об'єм апарата $V_p = 0,175 \text{ м}^3$.
- Коефіцієнт заповнення $K=0,7$.
- Тривалість культивування $\tau=72 \text{ год}$.
- Температура поживного середовища $t=30^\circ\text{C}$.

Конструктивний розрахунок інокулятора[22].

Номінальний об'єм апарата:

$$V_H = \frac{V_p}{K_3} = \frac{0,175}{0,7} = 0,25 \text{ м}^3.$$

Діаметр такого реактора згідно ГОСТ 6533-78:

$$D = 700 \text{ мм.}$$

Площа поверхні теплообміну сорочки:

$$F_m = 1,3 \text{ м}^2.$$

Розміри мішалки обираємо із співвідношення:

$$\frac{D}{d_m} = \frac{3}{4}.$$

Обираємо стандартну відкриту турбінну мішалку відповідно до ГОСТ 20680-75:

$$d_m = 220 \text{ мм.}$$

Співвідношення:

$$\frac{D}{d_m} = \frac{700}{220} = 3,2.$$

Відстань від дна реактора до мішалки:

$$h_1 = 0,4 \cdot d_m = 0,4 \cdot 0,22 = 0,088 \text{ м.}$$

Приймаємо:

$$h_m = 0,2 \cdot h_1 = 0,2 \cdot 0,088 = 0,0176 = 17,6 \text{ мм.}$$

Довжина лопатей:

$$l = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 220 = 48,4 \text{ мм.}$$

$$b = 0,1 \cdot d_m = 0,1 \cdot 220 = 22 \text{ мм.}$$

Решту конструктивних розмірів днища знаходимо згідно ГОСТ 6533-78.

- Відбортовка $h_b = 40 \text{ мм}$
- Внутрішня поверхня $F_{\text{дн}} = 0,62 \text{ м}^2$
- Об'єм $V_{\text{дн}} = 60,3 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3$

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

- Висота днища $h_{\text{дн}} = 175 \text{ мм}$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{н}} - 2V_{\text{дн}}}{0,785D^2} = \frac{0,25 - 2 \cdot 60,3 \cdot 10^{-3}}{0,785 \cdot 0,7^2} = 0,336 \text{ м.}$$

Висота стовпа рідини в апараті:

$$H_{\text{р}} = \frac{4(V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi D} + h_1 + h_{\text{в}} = \frac{4(0,25 - 60,3 \cdot 10^{-3})}{3,14 \cdot 0,7} + 0,175 + 0,04 = 0,424 \text{ м.}$$

Відстань від дна до верхньої точки мішалки:

$$h_3 = h_{\text{в}} + h_{\text{м}} = 0,04 + 0,022 = 0,062 \text{ м.}$$

Розрахунок перемішуючих пристроїв[22].

Фізико-хімічні показники середовища:

В'язкість середовища: $\mu_{\text{с}} = 804 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$

Густина середовища: $\rho_{\text{с}} = 996 \text{ кг/м}^3$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості: $\nu_{\text{с}} = 8,1 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$

Розраховуємо критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{nd_{\text{м}}^2}{\nu_{\text{с}}} = \frac{3 \cdot 0,22^2}{8,1 \cdot 10^{-7}} = 1,8 \cdot 10^5.$$

За графіком залежності $K_N = f(Re)$ визначаємо:

$$K_N = 6$$

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_{\text{р}} \cdot n^3 \cdot d_{\text{м}}^5 = 6 \cdot 996 \cdot 3^3 \cdot 0,22^5 = 83 \text{ Вт.}$$

Для ущільнення валу мішалки обираємо торцеве ущільнення.

Діаметр валу:

$$d_{\text{в}} = C \cdot d_{\text{м}} = 0,117 \cdot 0,22 = 0,02 \text{ м.}$$

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненні:

$$N_{\text{ущ}} = 6020d_{\text{в}}^{1,3} = 6020 \cdot 0,02^{1,3} = 37,2 \text{ Вт.}$$

Для термопар в реакторі установлені гільзи:

$$K_1 = 1,1.$$

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

Коефіцієнт рівня рідини:

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{0,424}{0,7}} = 0,778.$$

Коефіцієнт, що враховує наявність перегородок:

$$K_n = 1.$$

Потужність електродвигуна:

$$N_{\text{ел}} = \frac{K_n K_H \cdot \sum K_1 \cdot N_p + N_{\text{ущ}}}{\eta} = \frac{1 \cdot 0,0778 \cdot 1,1 \cdot 83 + 37,2}{0,85} = 510 \text{ Вт.}$$

Обираємо двигун з номінальною потужністю $N_H = 0,82 \text{ кВт}$. Маркування КМ32-125а.

Розрахунок воронки[22].

Параметр висоти завантаження апарата:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \frac{0,424}{0,7} + 1 = 5,85.$$

Параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_m Re_{\text{ц}}^{0,25}} = \frac{5,85}{8,4 \cdot 1 \cdot (1,8 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,033.$$

За графіком параметру розподілення швидкості ψ_1 для турбінної мішалки визначаємо:

$$\psi_1 = 1,2.$$

$$B = 6.$$

Глибина воронки:

$$h_B = \frac{B n^2 d_m^2}{2} = \frac{6 \cdot 3^2 \cdot 0,22^2}{2} = 1,3 \text{ м.}$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{\text{гр}} = H_p - h = 0,424 - 0,088 = 0,336 \text{ м.}$$

Глибина воронки перевищує гранично допустиму, то в апараті необхідно встановлювати відбивні перегородки.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розрахунок барботера[22].

Приймаємо приведену швидкість кисню в апараті $\omega_p=0,04$ м/с. таким чином, його витрата:

$$V_p = \frac{\pi}{V_H} \cdot D^2 \cdot \omega_p = \frac{3,14}{0,25} \cdot 0,7^2 \cdot 0,04 = 0,025 \text{ м}^3/\text{с}.$$

Діаметр труби барботера при швидкості газу в ній $\omega_6=25$ м/с складає:

$$d_6 = \sqrt{\frac{4V_p}{\pi\omega_6}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,025}{3,14 \cdot 25}} = 0,036 \text{ м}.$$

Середній діаметр барботера:

$$D_{cp} = 1,75d_m = 1,75 \cdot 220 = 385 \text{ мм}.$$

Густина повітря при температурі $t=30^\circ\text{C}$ і абсолютному тиску

$$p = 0,1 + p_{\text{наб}} + H_{\text{ж}}\rho_{\text{ж}}g \cdot 10^{-6} = 0,1 + 0,05 + 1 \cdot 1000 \cdot 9,81 \cdot 10^{-6} = 0,161 \text{ МПа}.$$

$$\rho_r = \frac{pT}{\rho_r T} = 1,29 \cdot \frac{0,161 \cdot 273}{0,1 \cdot 303} = 1,87 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}.$$

Швидкість газу в отворах барботеру:

$$\omega_0 = 3,4 \sqrt{\frac{d_6 \cdot 1000}{\rho_r}} = 3,4 \sqrt{\frac{0,036 \cdot 1000}{1,87}} = 4,4 \frac{\text{м}}{\text{с}}.$$

Прийmemo діаметр отворів в барботері $d_0=5$ мм, тоді їх загальна кількість складає:

$$z_0 = \frac{4V_p}{\pi d^2 \omega_0} = \frac{4 \cdot 0,025}{3,14 \cdot 0,005^2 \cdot 4,4} = 290.$$

Якщо всі отвори розмістити по колу діаметра D_{cp} в два ряди, то крок їх розташування буде:

$$t = \pi D_{cp} \left(\frac{2}{z_0} \right) = 3,14 \cdot 385 \cdot \left(\frac{2}{290} \right) = 8,3 \text{ мм}.$$

Крок розміщення отворів в цьому ряду складає:

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		

$$t_2 = \pi \cdot \frac{D_{\text{ср}}}{2} \cdot \frac{z_0}{2} = 3,14 \cdot \frac{385}{2} \cdot \frac{290}{2} = 4,2 \text{ мм.}$$

Тепловий розрахунок[22].

Погодинна кількість виділення тепла культурою:

$$Q_{\text{ч}} = \frac{5 \cdot 15670 \cdot 10^3}{3600 \cdot 24} = 906 \text{ Вт.}$$

15670 кДж/кг – тепловиділення цукру

5 кг – кількість цукру у середовищі

Тепловий баланс інокулятора:

$$Q_{\text{ч}} = Q_{\text{вод}} + Q_5.$$

Витрати на тепловипромінювання в навколишнє середовище приймаємо

2% від погодинної кількості виділеного тепла:

$$Q_5 = 0,02 Q_{\text{ч}} = 0,02 \cdot 906 = 18,12 \text{ Вт.}$$

Тепло, що відводиться водою:

$$Q_{\text{вод}} = Q_{\text{ч}} - Q_5 = 906 - 18,12 = 887,88 \text{ Вт.}$$

Розхід води для відводу тепла:

$$G_{\text{вод}} = \frac{Q_{\text{вод}}}{c(t_2 - t_1)} = \frac{887,88}{4190(22 - 15)} = 0,026 \text{ кг/с.}$$

$t_1 = 15^\circ\text{C}$ – температура води при вході в сорочку

$t_2 = 22^\circ\text{C}$ – температура води при виході з сорочки

Споживча поверхня охолодження інокулятора:

$$F = \frac{Q_{\text{вод}}}{k \Delta t_{\text{ср}}}.$$

$$\Delta t_6 = 30 - 15 = 15^\circ\text{C.}$$

$$\Delta t_{\text{м}} = 30 - 22 = 8^\circ\text{C.}$$

$$\frac{\Delta t_6}{\Delta t_{\text{м}}} = \frac{15}{8} < 2.$$

Для даного випадку середня різниця температур теплоносіїв:

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						71
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_{\bar{c}} + \Delta t_m}{2} = \frac{15 + 8}{2} = 11,5^\circ\text{C}.$$

Для апаратів з сорочками з перемішуванням мішалкою коефіцієнт тепловіддачі від перемішуючої рідини до стінки визначають за рівнянням:

$$Nu_c = 0,36 Re^{0,67} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu}{\mu_{ct}} \right)^{0,14}.$$

Критерій Нуссельта, що характеризує інтенсивність тепловіддачі на границі потік-стінка:

$$Nu_c = \frac{\alpha_1 D_{BH}}{\lambda}.$$

Для примусового перемішування мішалкою критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{\rho n d^3}{\mu}.$$

Прирівнюємо формули критеріїв Нуссельта:

$$\frac{\alpha_1 D_{BH}}{\lambda} = 0,36 \left(\frac{\rho n d^3}{\mu} \right)^{0,67} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu}{\mu_{ct}} \right)^{0,14}.$$

Звідси коефіцієнт тепловіддачі від перемішуючої рідини до стінки:

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= 0,36 \frac{\lambda}{D_{BH}} \left(\frac{\rho n d^3}{\mu} \right)^{0,67} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu}{\mu_{ct}} \right)^{0,14} \\ &= 0,36 \frac{0,618}{0,7} \cdot \left(\frac{996 \cdot 3 \cdot 0,22^3}{0,000804} \right)^{0,67} 5,42^{0,33} \cdot \left(\frac{0,000804}{0,000804} \right)^{0,14} \\ &= 668 \text{ Вт/м}^2 \cdot ^\circ\text{C}. \end{aligned}$$

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки інокулятора до охолоджуючої води:

$$\begin{aligned} \alpha_2 &= 0,23 \frac{\lambda}{D_3} \left(\frac{D_{BH}}{D_{BH} - D_3} \right)^{0,45} \left(\frac{\omega_p D_3 \rho}{\mu} \right)^{0,8} \left(\frac{3600 \mu s g}{\lambda} \right)^{0,43} \\ &= 0,23 \frac{0,584}{0,7} \left(\frac{0,73}{0,73 - 0,7} \right)^{0,45} \left(\frac{0,2 \cdot 0,73 \cdot 999}{0,00108} \right)^{0,8} \left(\frac{3600 \cdot 9,81 \cdot 4160 \cdot 0,00108}{0,584} \right)^{0,43} \\ &= 560 \text{ Вт/м}^2 \cdot ^\circ\text{C}. \end{aligned}$$

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Теплофізичні параметри води при середній температурі температури 17,5°C:

Густина $\rho=0,999 \text{ т/м}^3$.

Коефіцієнт теплопровідності води $\lambda=0,584 \frac{\text{Вт}}{\text{м}} \cdot ^\circ\text{C}$.

Внутрішній діаметр сорочки ферментеру $D_{\text{вн}} = 0,73 \text{ м}$.

Площа січення сорочки:

$$f = 0,785(D_{\text{вн}}^2 - D_3^2) = 0,785(0,73^2 - 0,7^2) = 0,034 \text{ м}^2.$$

Швидкість води в сорочці ферментера:

$$\omega_{\text{в}} = \frac{G_{\text{н}}}{3600 f \rho} = \frac{24,5}{3600 \cdot 0,034 \cdot 0,999} = 0,2 \frac{\text{м}}{\text{с}}.$$

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{1}{\alpha_2} + \delta/\lambda} = \frac{1}{\frac{1}{668} + \frac{1}{560} + \frac{0,01}{58,15}} = 289,5 \text{ Вт/м}^2 \cdot ^\circ\text{C}.$$

Коефіцієнт тепловіддачі стінки інокулятора: $\lambda=58,15 \text{ Вт/м} \cdot ^\circ\text{C}$.

Товщина стінки ферментера: $\delta=0,01 \text{ м}$.

Забруднення стінок відкладами забруднень призводить до погіршення коефіцієнта теплопередачі, тому для розрахунків взято:

$$k = 485 \cdot 1,163 = 564 \frac{\text{Вт}}{\text{м}} \cdot ^\circ\text{C}.$$

Площа поверхні охолодження рубашки:

$$F = \frac{Q_{\text{вод}}}{k \Delta t_{\text{ср}}} = \frac{887,88}{564 \cdot 11,5} = 0,2 \text{ м}^2.$$

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Для подачі розчини у труби використовуються насоси типу КМ-32-125а, потужність яких складає 3,6 кВт. Він має наступні характеристики:

- подача $10 \text{ м}^3/\text{год}$
- напор 16 м
- ККД 60%

Характеристика рідини, що може подаватись насосом:

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

- в'язкість до 250 н/м
- щільність до 1600 кг/м³
- температура від 20°C до 100°C

Для дозування речовин використовується об'ємно-ваговий дозатор FlexW15S, що має наступні характеристики:

- похибка 1,5%
- межа завантажування 0,1-30 кг
- продуктивність до 400 кг/год

Також апарат оснащений ресивером PB270.11.12, що має наступні показники:

- температурний режим від -20°C до +50°C
- робочий тиск 10 бар
- об'єм 500 л

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Охорона праці та дотримання вимог до навколишнього середовища є важливими аспектами мікробіологічного виробництва. Тому необхідно вживати заходів для забезпечення безпеки працівників та збереження навколишнього середовища.

Захист працівників. Необхідно встановити процедури безпеки, включаючи носіння засобів індивідуального захисту, таких як лабораторні халати, рукавички, окуляри та респіратори, в разі необхідності. Крім того, обов'язковим є проведення навчання та надання інструкцій з правильного використання обладнання та роботи на мікробіологічному виробництві. Також для безпеки працівників робочі приміщення повинні мати наступні характеристики: вологість повітря 60-65%, температура 18-20°C, забезпечення достатнього повітрообміну та відсутність пилу.

Управління відходами. Ефективне управління відходами є важливим аспектом мікробіологічного виробництва. Відходи, які містять мікроорганізми,

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						74
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

повинні бути належним чином утилізовані або знищені. Також необхідно використовувати відповідні протоколи та процедури для забезпечення біологічної безпеки. Це включає розробку і впровадження програми контролю забруднення, регулярне тестування культур на наявність забруднень, використання методів стерилізації та дезінфекції, а також ізоляцію робочих просторів.

Одним із небезпечних відходів мікробіологічних виробництв є відпрацьоване повітря. Його очищення можливе декількома шляхами: адсорбція, хемосорбція, абсорбція та перетворення токсичних компонентів в менші шкідливі.

					<i>ДП БТ9108.00.000 ПЗ</i>	Арк.
						75
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ док-м.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ВИСНОВКИ

1. У проєкті для виробництва порошку гентаміцину обрано продуцент *Micromonospora purpurea* ATCC 15835, продуктивність синтезу антибіотика якого складає 1146 мг/мл, що на 1,26 більше у порівнянні із батьківським штамом.
2. На основі опрацьованих джерел запропоновано схему отримання продуцента. В схемі використовується індукований мутагенез, а саме обробка ультрафіолетовим випромінюванням. Час опромінення складає 20 хвилин, довжина хвилі 253,7 нм, летальність 99%. Застосування даного методу збільшує продуктивність в 1,26 рази.
3. На основі фізіолого-біохімічних особливостей штаму *Micromonospora purpurea* ATCC 15835 було обрано поживне середовище та умови культивування. Поживне середовище містить в собі картопляний крохмаль, соєве борошно, магній сульфат, хлорид кобальту, крейду піногасник синтетичний та воду. Культивування відбувається протягом 96 годин при температурі 32°C, рН 7,0 з постійною аерацією 1м³/м³ середовища.
4. Враховуючі біологічні характеристики продуцента обрано конструкцію інокулятора, який забезпечує належне створення посівного матеріалу, якість якого впливає на кінцевий продукт. Вирощування культури в інокуляторі триває протягом 72 годин при температурі 30°C, рН 7,0 з постійною аерацією 1м³/м³ середовища та обертом мішалки 175 об/хв.
5. Розроблено технологічну та апаратурну схеми для виготовлення порошку гентаміцину для ветеринарного призначення по 0,2 г у флаконі.
6. Розроблена технологія виробництва гентаміцину відповідає санітарно-гігієнічним, екологічним нормам, техніці безпеки та охороні праці.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Головач О.О.					76	79
Конс.								
Керівн.		Піць В.В.						
Затверд.								
						КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Інструкція препарату «Мегенсан», виробник ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ». БХФЗ: вебсайт. URL: <http://bcpp.com.ua/product/megensan>
2. Becker, Bernd, and Matthew A. Cooper. "Aminoglycoside antibiotics in the 21st century." *ACS chemical biology* 8.1 (2013): 105-115.
3. Global Gentamycin Sulfate (CAS 1405-41-0) Market 2023-2028 by Size. The Express Wire: вебсайт. URL: https://www.theexpresswire.com/pressrelease/Global-Gentamycin-Sulfate-CAS-1405-41-0-Market-2023-2028-by-SizePrecisionreportsco_21189621
4. Wang C., Wang H., Chen R. et al. (2020). Recent advances in the biotechnological production of aminoglycoside antibiotics and their analogs.
5. Goodfellow, Michael, and S. T. Williams. "Ecology of actinomycetes." *Annual review of microbiology* 37.1 (1983): 189-216.
6. Wagman, Gerald H. "Antibiotics from micromonospora." *Annual Reviews in Microbiology* 34.1 (1980): 537-558.
7. Boumehira, Ali Zineddine, et al. "Recent progress on the development of antibiotics from the genus Micromonospora." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 21 (2016): 199-223.
8. Дж, Хоулт. "Определитель бактерий Берджи." *М.: Мир* 1 (1997): 1-429.
9. Genilloud, Olga. "Micromonospora." *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2015): 1-28.
10. Lee M. J., Deway D. Y. Production of Gentamicin by Micromonospora Purpurea: Studies on Fermentation Variables // *미생물학회지*. – 1979. – Т. 17. – №. 3. – С. 152-159.

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Головач О.О.			СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	Стадія	Архив
Конс.							77
							79
Керівн.		Піць В.В.				КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ	
Затверд.							

11. Micromonospora echinospora subsp. echinospora DSM 43816 is a mesophilic bacterium that builds an aerial mycelium and produces antibiotic compounds. BacDive: вебсайт. URL: <https://bacdiver.dsmz.de/strain/7972>
12. Wei, Zeng, et al. "Exclusive production of gentamicin C1a from Micromonospora purpurea by metabolic engineering." *Antibiotics* 8.4 (2019): 267.
13. Isoherranen, Nina, Eran Lavy, and Stefan Soback. "Pharmacokinetics of gentamicin c1, c1a, and c2 in beagles after a single intravenous dose." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44.6 (2000): 1443-1447.
14. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEГ, 2001. — 556
15. Abou-Zeid, A. A., and Y. M. Shehata. "Gentamicins." *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie* 132.2 (1977): 97-108.
16. Rosenkrantz, Bernard E., et al. "Gentamicin sulfate." *Analytical profiles of drug substances*. Vol. 9. Academic Press, 1981. 295-340.
17. Katzung, Bertram G. *Basic and clinical pharmacology*. 2012.
18. Braesel, Jana, et al. "Complete genome of Micromonospora sp. strain B006 reveals biosynthetic potential of a Lake Michigan actinomycete." *Journal of natural products* 81.9 (2018): 2057-2068.
19. Qattan, Shaza YA, and Khattab AA. "GENTAMICIN PRODUCTION BY CULTURAL OPTIMIZATION SYSTEM AND GENETICALLY IMPROVED MUTANTS OF MICROMONOSPORA ECHINOSPORA." *Pharmacophore* 11.1 (2020).
20. Himabindu, M., Ravichandra Potumarthi, and Annapurna Jetty. "Enhancement of gentamicin production by mutagenesis and non-nutritional stress conditions

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		

in *Micromonospora echinospora*." *Process Biochemistry* 42.9 (2007): 1352-1356.

21. Кантере, В. М., et al. "Основы проектирования предприятий микробиологической промышленности." *М.: Агропромиздат* (1990).

22. Ружинська, Людмила Іванівна, et al. "Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв." (2014).

					ДП БТ9108.00.000 ПЗ	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		