



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56589

(13) A

(51) 7 A23K1/17

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА БІОВІТУ

1

2

(21) 2002076245

(22) 26 07 2002

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. №5, 2003 р.

(72) Сандул Петро Пилипович, Пилев Михайло  
Володимирович, Верховод Василина Василівна(73) ВІДКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО  
"БІОЛІК"

(57) Спосіб виробництва біовіту шляхом глибинно-го культивування продуцента хлортетрацикліну в стерильних умовах, який включає вирощування посівного матеріалу на поживному середовищі, приготування ферментаційного середовища, внесення посівного матеріалу в ферментаційне середовище для вирощування промислової культури, підлужування культуральної рідини, фільтрацію з відокремлення міцеляльної маси і її сушіння, який **відрізняється** тим, що як продуцент хлортетрацикліну використовують культуру *Streptomyces aureofaciens* шт. 633-ФУ, посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого складу, мас. %

борошно кукурудзяне	5,0-6,0
або зерно кукурудзи мелене	6,0-7,3

екстракт кукурудзяний	5,0-6,0
пропінол	0,02
або жир свинячий	0,2
вода питна	80-90,

промислову культуру вирощують у ферментаційному середовищі такого складу, мас. %

зерно кукурудзи мелене	7,0-8,6
екстракт кукурудзяний	0,5-0,6
амоній хлористий	0,3-0,4
селітра аміачна	0,5-0,6
крейда	0,8-1,0
бензил роданістий	0,0003
кобальт хлористий	0,0002
риб'ячий жир	0,2,

причому посівний матеріал і ферментаційне середовище подають у ферментатор з ліній, які розташовані нижче його купола, при вирощуванні промислової культури контролюють і підтримують значення рН культуральної рідини, а перед фільтрацією культуральну рідину додатково нагрівають до 80°C, крім того вирощування посівного матеріалу ведуть шляхом розсіву культуральної рідини з ферментатора

Винахід відноситься до галузі ветеринарної медицини і може бути використаний при виробництві ветеринарного препарату "Біовіт"

Біовіт - це ветеринарний препарат, до складу якого входить антибіотик хлортетрациклін та вітамін В<sup>А</sup>. Препарат застосовується з лікувальною метою при пастерельозі, стерехіозі, сальмонельозі, бронхопневмоніях телят, поросят, пушних звірів, а також при колісентицеї молодняка, птиці.

Виробництво біовіту складається з таких стадій: приготування та вирощування посівного матеріалу, вирощування промислової культури та процес біосинтезу в робочих ферментаторах, відокремлення та сушка міцеляльної маси, стандартизація препарату.

Для промислових установок на заводах використовують глибинний спосіб вирощування продуцента антибіотика в стерильних умовах.

За прототип вибраний спосіб виробництва біо-

віту, описаний в книзі В.Б. Фремея "Производство кормового биомасса на спиртовых заводах" - М: издавниство "Пищевая промышленность", 1966, який включає вирощування посівного матеріалу на поживному середовищі, приготування ферментаційного середовища та вирощування промислової культури, підлужування культуральної рідини, фільтрацію з відокремлення міцеляльної маси і її сушку.

В описаному способі для вирощування посівного матеріалу використовується поживне середовище - водна суміш крохмалю і кукурудзяного екстракту з додаванням піногасника - кашалотового жиру. Промислову культуру вирощують в ферментаторах при неперервному перемішуванні і аерації в ферментаційному середовищі, що містить кукурудзяний екстракт, борошно або картопляний крохмаль, азотнокислий амоній, поварену сіль, крейду, бензил роданістий та кобальт хлористий.

(13) A

(11) 56589

(19) UA

В результаті отримують кормовий біоміцин, 1 кг якого містить 40 - 50г Чистого антибіотика і 12 - 16мг вітаміна B<sub>12</sub>

Вихід препарату складає не більше 2,5кг з 1м<sup>3</sup> культуральної рідини

Причинами такого низького виходу є низька продуктивність штаму, незбалансований склад ферментаційного середовища як по якісному, так і по кількісному складу,

втрати хлортетрацикліну при виробництві, нестабільність процесу біосинтезу, низька асептика виробництва

В основу винаходу поставлена задача розробки способу виробництва біовіту, в якому за рахунок введення нових операцій і зміни складу поживних середовищ досягається підвищення продуктивності штаму культури, підвищення активності хлортетрацикліну ферментаційного середовища, покращення асептики виробництва, зниження втрат хлортетрацикліну і стабілізація процесу біосинтезу в ферментаторі, що приводить до збільшення виходу (з'єму) препарату з кубічного метра культуральної рідини

Поставлена задача вирішується тим, що в способі виробництва біовіту шляхом глибинного культивування продуцента хлортетрацикліну в стерильних умовах, який включає вирощування посівного матеріалу на поживному середовищі, приготування ферментаційного середовища, внесення посівного матеріалу в ферментаційне середовище для вирощування промислової культури, підключування культуральної рідини, фільтрацію з відокремленням міцеляльної маси і її сушку, згідно винаходу як продуцент хлортетрацикліну використовують культуру *Streptomyces aureofaciens* шт. 633-ФУ, посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого складу, мас % борошно кукурудзяне - 5,0 - 6,0 або зерно кукурудзи мелене - 6,0 - 7,3, екстракт кукурудзяний - 5,0 - 6,0, пропінол - 0,02 або жир свиний - 0,2, вода питна - 80 - 90, промислову культуру вирощують в ферментаційному середовищі такого складу, мас % зерно кукурудзи мелене - 7,0 - 8,6, екстракт кукурудзяний - 0,5 - 0,6, амоній хлористий - 0,3 - 0,4, селтра аміачна - 0,5 - 0,6, крейда - 0,8 - 1,0, бензил роданістий - 0,0003, кобальт хлористий - 0,0002, риб'ячий жир - 0,2 Посівний матеріал і ферментаційне середовище подають в ферментатор з ліній, які розташовані нижче його купола, при вирощуванні промислової культури контролюють і підтримують значення рН культуральної рідини, а перед фільтрацією культуральну рідину додатково нагрівають до 60°C, крім того, вирощування посівного матеріалу ведуть шляхом розсіву культуральної рідини з ферментатора

Посівний матеріал вирощують шляхом розсіву культуральної рідини з ферментатора. Виділені моноізольати культури перевіряють на продуктивність. Продуктивність моноізолятів досягає 10000 - 11000мкг/см<sup>3</sup>, а нароблених з них робочих партій - 9500 - 10000мкг/см<sup>3</sup>. Отримана таким шляхом культура при вирощуванні її в ферментаторі працює набагато продуктивніше і є більш стійкою до несприятливих умов в процесі виробництва

Таким чином, культура адаптована до умов

виробництва, проявляє більш продуктивні властивості, ніж та, яка зберігається і розмножується з косяків, як в прототипі

Підвищення якості та продуктивності культури досягається за рахунок оптимального складу поживного середовища для посівних апаратів та застосування більш ефективних піногасників, які беруть в меншій кількості. Так, застосування пропінолу або жиру свиного набагато покращує процес піногасіння, що дає змогу ефективно завоювати культурою кисень повітря. Це в свою чергу впливає на якість і швидкість росту культури в посівному апараті

Підбір оптимального складу ферментаційного середовища є головним фактором, який забезпечує високий рівень активності культуральної рідини. Запропонований склад ферментаційного середовища дозволяє підвищити активність культуральної рідини до 5300 - 5800мкг/см<sup>3</sup>, що приводить до збільшення з'єму препарату і економії сировини та допоміжних матеріалів

Процес синтезу хлортетрацикліну проходить в стерильних умовах. Наявність сторонньої мікрофлори негативно впливає на процес біосинтезу, пригнічує ріст культури, знижує нагромадження хлортетрацикліну

Покращення асептики виробництва досягається за рахунок того, що посівний матеріал та ферментаційне середовище подають в ферментатор з ліній, які знаходяться нижче купола ферментатора, що дає змогу не інфікувати культуральну рідину в процесі росту промислової культури. На кресленні (Фіг) показана схема подачі посівного матеріалу та ферментаційного середовища в ферментатор, де на фігурі зображений ферментатор 1, трубопровід подачі посівного матеріалу 2, трубопровід подачі ферментаційного середовища 3, трубопровід подачі повітря 4, паропровід 5, парові вентилі 6, вентилі подачі повітря 7, вентилі подачі ферментаційного середовища 8, вентилі подачі посівного матеріалу 9, трубопровід подачі культуральної рідини на фільтрацію 10

На відміну від прототипу, перед поданням культуральної рідини на фільтрацію її додатково нагрівають до 60°C. Це дає змогу скоротити час фільтрації до 4 - 8 годин, а також знизити втрати активності

В процесі росту культури в ферментаторі може порушитись масообмін (змінюється густина, недостатньо повітря, розбалансування складу ферментаційного середовища). В результаті може знизитися рН культуральної рідини до значення 5,0 - 5,2 при нормі 5,7 - 6,0. При низькому значенні рН культуральна рідина стає рідкою, припиняється нагромадження антибіотика і її слід передати на фільтрацію

Згідно запропонованого способу, рН культуральної рідини контролюють в процесі росту промислової культури і стабілізують значення рН до 5,7 - 6,0 шляхом внесення в ферментатор необхідної кількості крейди. Це дає змогу продовжувати процес біосинтезу до кінця і досягти активності культуральної рідини до 5000мкг/см<sup>3</sup>

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє підвищити з'єм препарату з 1м<sup>3</sup> культуральної рідини

## Приклад

Культуральну рідину з ферментатора розсівають на чашки Петрі з агаризованим середовищем № 12 методом розведень. Чашки поміщають в термостат і вирощують на протязі 12 - 14 діб при температурі 28°C. Відбирають чашки, на поверхні агару яких виросло 30 - 40 окремих колоній. Спори з поверхні кожної колонії переносять в пробірку з скошеним агаризованим середовищем №12. Пробірки поміщають в термостат на 12 - 14 діб і вирощують при температурі 28°C. Кожний моноізолят перевіряють на продуктивність шляхом ферментації культури в колбах з ферментаційним середовищем. Колби поміщають на качалки з обертами 240 - 260об/хв. Ферментацію ведуть на протязі 7 - 8 діб при температурі 28°C.

Визначають активність культуральної рідини із колб і відбирають високоактивні моноізольати. Активність моноізолятів досягає 10000 - 11000мкг/см. Високоактивні моноізольати використовують для наробки робочих партій, які потім застосовують у виробництві.

Для вирощування культури в посівних апаратах готують поживне середовище такого складу:

Зерно кукурудзи мелене	109,5кг
Екстракт кукурудзяний	90,0кг
Пропінол	0,3кг
Вода питна	1300,2л
Значення рН до стерилізації	6,8 - 7,2

Середовище стерилізують при температурі 128°C на протязі 30 хвилин, охолоджують до 28°C і засівають міцеліальною культурою із колб в кількості 1,2л. Процес вирощування ведуть при температурі 28°C на протязі 20 - 32 год. Після закінчення росту, культуру вносять в ферментаційне

середовище, яке приготовлене в ферментаторі об'ємом 63м<sup>3</sup>.

Ферментаційне середовище (V заправки = 31,5м<sup>3</sup>), має такий склад:

Зерно кукурудзи мелене	2299,5кг
Екстракт кукурудзяний	157,5кг
Амоній хлористий	100,8кг
Амоній азотнокислий (селітра)	157,5кг
Крейда мелена природна	258,3кг
Бензил роданістий	94,5г
Кобальт хлористий	63,0г
Риб'ячий жир	63,0кг
Вода	28463,4л

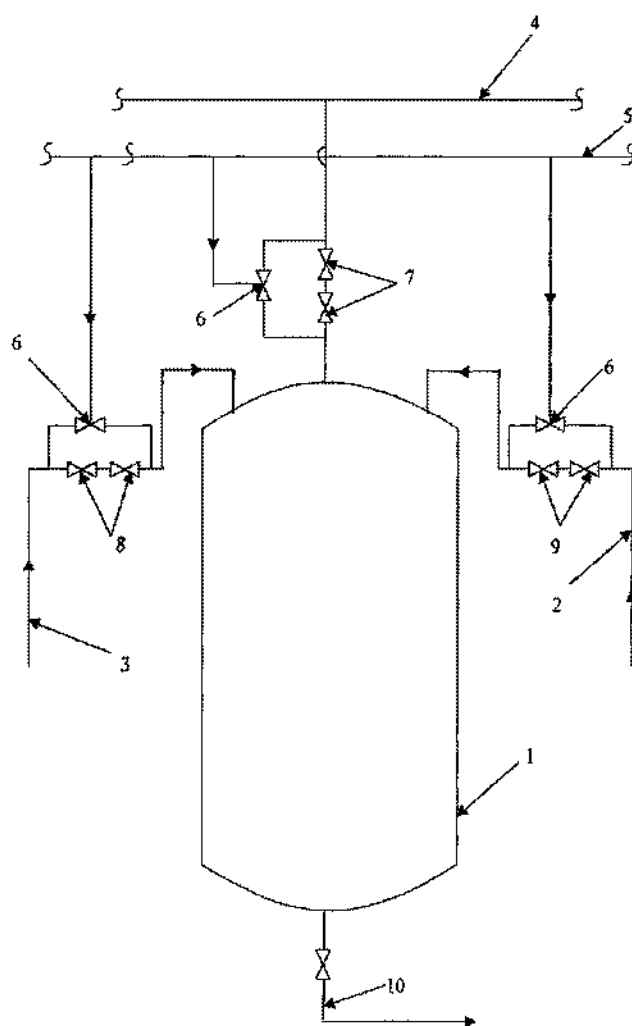
Процес вирощування культури та біосинтезу хлортетрацикліну ведуть на протязі 72 годин. В процесі росту промислової культури контролюють температуру, значення рН, розвиток культури, стерильність та визначають активність культуральної рідини.

При порушенні рН культуральної рідини (зниження рН до 5,0 - 5,2), вносять 30 - 40кг крейди для стабілізації рН до 5,7 - 5,9.

Активність культуральної рідини на 72 годину росту становить 5500мкг/см<sup>3</sup>. Далі культуральну рідину підлужують до рН 8,0 - 8,4, підігрівають до 60°C і фільтрують на рамних фільтр-пресах. Фільтрат видаляють, а міцеліальну масу висушують в паровій стрічковій сушарці до вологості 8 - 10%.

Сухий продукт з вмістом хлортетрацикліну 150000мкг/г, розмелюють та стандартизують пшеничним борошном до отримання необхідного вмісту хлортетрацикліну в препараті.

З'єм препарату при реалізації запропонованого способу досягає 4,8кг/м<sup>3</sup>.



Фіг.