

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”**

Факультет біотехнології і біотехніки
(повна назва інституту/факультету)

Кафедра промислової біотехнології
(повна назва кафедри)

Дипломний проект

на здобуття ступеня бакалавра

зі спеціальності 6.051401 Біотехнологія
(код та назва напрямку підготовки або спеціальності)

на тему: Технологія виробництва бензилпеніциліну. Дільниця біосинтезу

Виконала: студентка 4 курсу, групи БТ-11
(шифр групи)

Данилова Вікторія Вікторівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник асист., к.т.н. Тітова Л.О.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Консультанти Розділ 5 доц., к.т.н. Ружинська Л.І.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

Розділ 6 доц., к.т.н. Орленко А.Т.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

Рецензент ст. Викл., к.т.н. Жукова В.С.
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

КИЇВ – 2015 РОКУ

Перспективним напрямком розвитку сучасних науки та виробництва є пошук нових біологічно-активних речовин з лікувально-профілактичними властивостями та нових продуцентів для їх отримання. При цьому перевага надається препаратам, які отримуються саме біотехнологічним шляхом.

Терміном „антибіотик” прийнято називати речовини мікробного, рослинного або тваринного походження, що здатні пригнічувати розвиток організмів або викликати їхню загибель. Аналіз літератури дає підстави стверджувати, що потенціал мікроорганізмів як джерела нових антибіотиків ще не вичерпаний. Окрім цього, використання можливостей генної інженерії та молекулярної біотехнології дає змогу сподіватися на отримання надпродуцентів нових антибіотиків, що виправдовуватимуть необхідні інвестиції у біотехнологічну промисловість.

У даний час відомо більше 10 тисяч природних і синтетичних антибіотиків. Більше 100 з них застосовують у медицині, а також для захисту від хвороб тварин і рослин. Найбільш відомим та популярним з моменту відкриття є антибіотик пеніцилін та його похідні. Пеніциліни – найбільш потужна і цінна зброя проти інфекцій, викликаних коками та деякими анаеробними паличками. Вони малотоксичні, володіють здатністю лікувати широкий спектр захворювань.

Бензилпеніцилін – природний β -лактамний антибіотик з антибактеріальною дією. Він призначений для лікування інфекції легень та дихальних шляхів, сечо- та жовчовидільних шляхів, ранових інфекцій, гнійних інфекцій шкіри, м'яких тканин, слизових оболонок, різних форм ангіні, дифтерії, скарлатини, гонореї, сифілісу тощо.

На основі аналізу структури українського ринку антибіотиків виявлено, що найбільшим попитом користується бензилпеніцилін. За даними Держстату за підсумками 2013 року українські підприємства збільшили виробництво лікарських препаратів, що містять пеніцилін та інші антибіотики на 16,4% порівняно з 2012 роком – до 1050 тонн. Так як бензилпеніцилін користується попитом, то необхідно забезпечити населення України вітчизняними

лікарськими засобами. Поширення набули як натрієва, так і калієва солі бензилпеніциліну.

В даному дипломному проєкті в якості продуценту бензилпеніциліну натрієвої солі було обрано *Penicillium chrysogenum* DS 17690.

Окрім цього субстанція бензилпеніциліну використовується для отримання б-амінопеніцилінової кислоти і подальшого отримання напівсинтетичних пеніцилінів. У зв'язку з цим питання інтенсифікації процесу виробництва бензилпеніциліну і збільшення обсягів виробництва даного препарату є актуальним в наш час.

Тому метою даного дипломного проєкту є вдосконалення ділянки біосинтезу технології виробництва субстанції бензилпеніциліну натрієвої солі.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні завдання:

1. Обґрунтувати вибір продуценту бензилпеніциліну;
2. Скласти технологічну та апаратурну схему виробництва;
3. Підібрати оптимальний склад поживного середовища;
4. Скласти матеріальний баланс на стадію біосинтезу бензилпеніциліну;
5. Обрати конструкцію ферментера для проведення біосинтезу та виконати конструкційний та тепловий розрахунки апарату.
6. Врахувати всі вимоги охорони праці, пожежної та екологічної безпеки, проаналізувати шкідливі та небезпечні фактори виробництва та запропонувати методи їх попередження та уникнення в умовах виробництва.

Після того, як було встановлено, що пеніцилін володіє сильним лікувальними властивостями, почалися інтенсивні пошуки продуценту цього антибіотику. В результаті було встановлено, що пеніциліни можуть синтезувати *Penicillium notatum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*, *P. turbatum*, *P. steckii*, *P. corylophylum*, а також деякі види *Aspergillus* (*Asp. flavus*, *A. janus*, *A. nidulans*). *Penicillium chrysogenum* є основним продуцентом пеніциліну G (бензилпеніциліну).

В даному дипломному проєкті запропоновано для біосинтезу бензилпеніциліну натрієвої солі запропоновано використовувати один з найбільш продуктивних сучасних штамів - *Penicillium chrysogenum* DS 17690. На відміну від свого попередника *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255, обраний штам продукує більш ніж в два рази бензилпеніциліну.

Розглянемо основні морфологічні особливості обраного штаму, *Penicillium chrysogenum* DS 17690. Гіфи прямі, розгалужені, шириною 10-11 мкм, довжиною 50-80 мкм, конідії круглі, діаметр 4-6 мкм, мають гладку стінку. На конідієносці 3-5 метул довжиною 8-12 мкм та шириною 2-4 мкм. На кінці метул може знаходитись від 4 до 7 фіалід; вони мають видовжену форму і сягають в довжину 7-10 мкм та шириною 2 мкм.

Штам *Penicillium chrysogenum* DS 17690 на щільних поживних середовищах утворює опуклі колонії, складчасті з кратероподібним центром, бежеві. Край колонії нерівний, обрубаний, зворотна сторона колонії від жовтого до бурого кольору. Пігменту немає. Діаметр колонії 10-16 мм. Органічний субстрат – пшоно, ячмінь. Ріст хороший, світло-бежевий колір. На пшоні при підвищеній вологості при 2-5°C спостерігається позеленіння культури, починаючи з 20 діб зберігання.

Кінцевим продуктом виробництва є субстанція бензилпеніциліну натрієвої солі. Бензилпеніцилін (у формі натрієвої або калієвої солі) – білий помірно гігроскопічний дрібнокристалічний гіркий на смак порошок. Легко руйнується при дії кислот, лугів і окиснювачів, при нагріванні у водних розчинах, а також при дії пеніцилінази. Повільно руйнується при зберіганні у розчинах при кімнатній температурі.

Біосинтез пеніциліну G починається з утворення трипептиду δ -(L- α -аміноадипін)-L-цистеїн-D-валін. Перший фермент біосинтезу пеніциліну, δ -(L- α -аміноадипін)-L-цистеїн-D-валін синтетаза, знаходиться під контролем гена *pcbAB*. Після цього відбувається утворення β -лактамового кільця за допомогою ізопеніцилін-N-синтетази (циклази), що в свою чергу знаходиться під контролем гена *pcbC*. Далі аміногрупи аміноадипінової кислоти замінюються

на фенілгрупи за участі ізопеніцилін-N-ацилтрансферази, що знаходиться під котролем гена *penDE*.

Вивчаючи штам *Penicillium chrysogenum* DS 17690, що було використовується для отримання бензилпеніциліну, було визначено, що геном даного мікроорганізму складається з чотирьох хромосом. Ядерний геном представлений 32,19 мільйонами пар основ. Три гени *pcbAB*, *pcbC* і *penDE*, що відповідають за біосинтез пеніциліну, утворюють кластер генів і розташовані у першій хромосомі.

Одним з ферментів, що бере участь в активації фенілоцтової кислоти під час біосинтезу пеніцилінів G та за допомогою якого відбувається приєднання попередника бензилпеніциліну є фенілацетил-CoA лігаза, що кодується геном *phl*. Цей ген розташований за межами кластеру генів біосинтезу пеніциліну

Технологічний процес починається з допоміжних робіт, до яких належать: санітарна підготовка виробництва, підготовка вентиляційного повітря для приміщень класів C і D, підготовку повітря для аерації, підготовка і стерилізація піногасника, підготовка і стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу, підготовка і стерилізація поживного середовища для ферментера, підготовка посівного матеріалу.

Поживне середовище, що використовується для отримання посівного матеріалу містить: глюкозу, лактозу, мінеральні солі, фенілоцтову кислоту, кукурудзяний екстракт. Поживне середовище для культивування продуценту надходить із змішувача підготовки поживного середовища. Температура поживного середовища перед засівом повинна бути 26 ± 1 °C., після загрузки посівного матеріалу з колб, у апараті створюють тиск $0,05 \pm 0,02$ МПа. В апарат неперервно подається стерильне повітря. Процес проводиться при постійному перемішуванні мішалкою.

Після вирощування посівного матеріалу, він передається за допомогою насосу у ферментер для виробничого біосинтезу.

Процес біосинтезу пеніциліну проводять за температури поживного середовища 26 ± 1 °C у ферментері міцелієм, вирощеним у посівному апараті.

Процес ферментації триває від 110 до 140 год. До ферментеру безперервно подають очищене повітря у кількості: від 0,8-1,2 м³ повітря на 1 м³ середовища. Тиск у ферментері підтримують від 0,03 до 0,08 МПа. Процес ферментації ведеться за працюючої у безперервному режимі мішалки із кутовою швидкістю 200 об/хв. Для гасіння піни, періодично додають невеликі порції піногасника.

Процес ферментації припиняється при досягненні активності культуральної рідини не нижче 10 000 Од/мл.

Після цього, одержана культуральна рідина до збірника, де відбувається підготовка культуральної рідини до процесу обробки. Отримана культуральна рідина надходить до барабанного вакуум-фільтра, де відбувається подальше відділення міцелію від нативного розчину.

Видалення білків з нативного розчину відбувається в збірнику куди подається гостра пара для коагуляції білків.

Після охолодження нативного розчину в, він подається у збірник, куди додається авіроль (для кращого розділення на сепараторі).

Нативний розчин передається на двухступеневу екстракцію бутилацетатом.

Для освітлення другого бутилацетатного екстракту використовують активоване вугілля.

Прозорий другий бутилацетатний екстракт за допомогою насоса поступає до реактора на перетворення бензилпеніциліну до натрієвої солі бензилпеніциліну. На цій стадії у реактор-змішувач додається гідроксиду натрію. Реакція проходить при температурі 2-8 °С та рН = 6,4-7,0.

Завершальними етапами є вакуум випарювання та сушіння суміші.

Готовий продукт фасується в подвійні поліетиленові пакети по 10 кг.

Також було розраховано ферментер об'ємом 10 м³. (плакат № 3). Апарат обладнаний лопатевою мішалкою, сорочкою та барботером, коефіцієнт заповнення 0,6, число обертів мішалки 3 с⁻¹.

Даний дипломний проект виконано з урахуванням вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки підприємства.

Отже, можна зробити висновки:

1. Обрано суперпродуцент бензилпеніциліну - *Penicillium chrysogenum* DS 17690, який було отримано шляхом хімічного мутагенезу, в результаті чого продуктивність штаму збільшилась більш ніж в два рази.

2. За результатами аналізу фізико-хімічних властивостей бензилпеніциліну та трофічних потреб продуценту запропоновано до основного складу поживного середовища, що містить глюкозу, лактозу, мінеральні солі, фенілоцтову кислоту, додати кукурудзяний екстракт - відходи кукурудзяно-крохмального виробництва, що зменшує вартість поживного середовища.

3. Складено матеріальний баланс для стадії промислового біосинтезу бензилпеніциліну. Після стадії біосинтезу з 5,8 тис. літрів сировини можна отримати близько 61 кг бензилпеніциліну в культуральній рідині.

4. Обрано технологічну схему, яка складається з допоміжних робіт і стадій основного технологічного процесу та апаратурну схему для реалізації технологічного процесу, що дозволяє отримати продукт належної якості.

5. Запропоновано конструкцію ферментера об'ємом 10 м³ з лопатевою мішалкою. Для попередження пошкодження міцелію лопасті мішалки вкриті захисним полімерним покриттям - пентопластом. Приведені технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки ферментера, що підтверджують надійність даної констукції та придатність ферментера для найбільш ефективного проведення процесу виробничого біосинтезу.

6. Розглянуто основні питання, що стосуються охорони праці, пожежної та екологічної безпеки. Проаналізовано шкідливі та небезпечні фактори виробництва та запропоновано методи їх попередження.

