

**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 лінкоміцину. Дільниця підготовки
поживного середовища

Виконав (-ла): студент (-ка) 4 курсу, групи БТ-11
(шифр групи)

Грабильнікова Кристина Валеріївна
(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 професор, д.т.н. Саблій Л. А.
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

Не дивлячись на сучасний розвиток медицини потреба в антибактеріальних препаратах зростає з кожним роком. Одним із вже традиційних антибіотиків є лінкоміцин.

Лінкоміцин – природний антибіотик з групи лінкозамідів, що у терапевтичних дозах діє бактеріостатично, при більш високих дозах має бактерицидну дію. Чутливими до дії лінкоміцину є грампозитивні мікроорганізми: аеробні – стафілококи, стрептококи, в тому числі пневмококи, а також анаеробні неспороутворюючі мікроорганізми – клостридії, пептококи, пептострептококи, фузобактерії, пропіонобактерії.

Не дивлячись на те, що лінкоміцин застосовується для медичних цілей більше п'ятдесяти років, попит на нього залишається стабільно високим. Лінкоміцин назначають при інфекціях кісток, суглобів (остеомієліти, септичні артрити); інфекціях верхніх та нижніх дихальних шляхів; гнійних інфекції шкіри та м'яких тканин, тощо. Крім того лінкоміцин використовують як антибіотик резерву при інфекціях, що викликані мікроорганізмами, що є резистентними до пеніциліну та деяких інших антибіотиків.

Враховуючи вище написане, дослідження технології виробництва лінкоміцину є надзвичайно актуальним на сьогоднішній день.

Метою дипломного проекту було вдосконалення ділянки підготовки поживного середовища технології виробництва лінкоміцину.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Підібрати продуцент антибіотику лінкоміцину для промислового культивування. Проаналізувати методи отримання високопродуктивного штаму-продуценту та розробити схему його отримання.
2. Охарактеризувати кінцевий продукт виробництва та обґрунтувати біохімічні основи виробництва лінкоміцину.
3. Підібрати склад поживного середовища та умови проведення біосинтезу, які забезпечать максимальний вихід лінкоміцину.
4. Обрати технологічну та апаратурні схеми виробництва субстанції лінкоміцину гідрохлориду.

5. Скласти матеріальний баланс для стадії підготовки поживного середовища для біосинтезу лінкоміцину.

6. Обрати конструкцію реактора-змішувача, для підготовки поживного середовища. Виконати технологічний та конструктивні розрахунки реактора-змішувача.

7. Врахувати вимоги охорони праці, екологічної та пожежної безпеки, що ставлять перед виробництвом. Запропонувати комплекс заходів та засобів захисту від дії шкідливих та небезпечних факторів виробництва лінкоміцину.

Лінкоміцин – це природний антибіотик, синтез якого характерен для деяких видів актиноміцетів роду *Streptomyces*. Основним промисловим продуцентом лінкоміцину є стрептоміцет виду *Streptomyces lincolnensis*. В даному дипломному проекті в якості промислового продуценту обрано штам *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466.

S. lincolnensis – облигатний аероб. Він не вимогливий до поживних субстратів, не потребує факторів росту. Хемоорганотроф з метаболізм окиснювального типу. Оптимальна температура росту 25-35 °С; оптимальний для росту діапазон рН 6,5-8.

Ланцюжки спор *Streptomyces lincolnensis* прямі або звиті, довгі, часто розгалужені, поверхня спор виду – гладка.

Кінцевим продуктом виробництва є субстанція лінкоміцину гідрохлориду. Лінкоміцин (у вигляді лінкоміцину гідрохлориду) є кристалічним порошком білого або майже білого кольору, що має гіркий смак. Він легко розчиняється в воді, мало розчинний у 96% етиловому спирті, дуже мало розчинний в ацетоні та практично не розчинний в ефірі. Лінкоміцин стабільний на повітрі та сонячному світлі.

Біосинтез лінкоміцину відбувається в клітинах актиноміцетів роду *Streptomyces* шляхом конденсації 4-пропіл-проліну, що є похідним амінокислоти тирозину та метилтіолінкозаміду – похідного D-глюкози.

Конденсація цих двох попередників шляхом утворення амідного зв'язку утворює N-диметиллінкоміцин, який після метилювання перетворюється на лінкоміцин.

Антибактеріальний механізм лінкоміцину ґрунтується на принципі зворотного зв'язування лінкоміцину з 50S-субодиницею рибосоми бактерій, що призводить до порушення процесу синтезу білка і руйнування мікроорганізму. У терапевтичних дозах діє бактеріостатично, при більш високих дозах має бактерицидну дію.

Найбільш вивченим в генетичному плані серед стрептоміцетів є вид *Streptomyces coliecolor* A3(2), тому він використовується в якості модельного об'єкту у генетичних і генно-інженерних дослідженнях стрептоміцетів.

Геном *S. coliecolor* A3(2) представлений єдиною лінійною хромосоною з сайтом початку реплікації (*oriC*), що розташований у центрі, та кінцевими інвертованими повторами (TIRs – terminal inverted repeats), які містять білкові молекули на 5'-кінцях, що є ковалентно зв'язаними.

Більшість життєво важливих для організму генів, які контролюють синтез амінокислот, реплікацію ДНК, транскрипцію та трансляцію, клітинний поділ – розташовані в центральній ділянці хромосоми. Натомість, локуси, що контролюють життєво не важливі функції, наприклад, біосинтез вторинних метаболітів, розташовуються в плечових ділянках хромосоми.

Для створення високопродуктивного штаму *Streptomyces lincolnensis* піддавали селекції з використанням індукованого мутагенезу.

На початку проводили підготовку штаму до селекційної роботи. Для цього культуру піддавали чистці та стабілізації.

Найбільш продуктивний субклон, отриманий в процесі штучного добору піддавали дії індукованого мутагенезу.

Обробку всіма мутагенами проводили на суспензії повітряних спор. На суспензію послідовно діяли фізичним мутагеном (УФ-випромінювання) та хімічними (обробка N-нітрозоетилсечовиною та 1-метил-3-нітро-N-

нітрозогуанідином). Обробку обома хімічними мутагенами проводили при постійному струшуванні культури.

Завершальним етапом проведення індукованого мутагенезу була повторна обробка культури УФ-випромінюванням.

Технологічний процес виробництва лінкоміцину починається з допоміжних робіт, які включають в себе санітарну підготовку виробництва, підготовку поживного середовища, підготовку посівного матеріалу, а також містить стадії основного технологічного процесу, стадії пакування, маркування готового продукту та стадії знешкодження відходів.

Поживне середовище, що використовують для вирощування посівного матеріалу містить дріжджовий гідролізат, моногідрат глюкози та гідролізат казеїну, а поживне середовище для виробничого культивування – моногідрат глюкози, кукурудзяний екстракт, соєве борошно та мінеральні солі.

Змішування компонентів поживного середовища відбувається в реакторах-змішувачах за температури $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ при 120 об/хв протягом 20 хв. Стерилізацію термостабільних компонентів проводять гострою парою при надлишковому тиску 1-2 атм. Середовище нагрівають до температури $125\pm 3^{\circ}\text{C}$. Тривалість стерилізації становить 40 хвилин. Термолабільні компоненти стерилізують при надлишковому тиску 0,8 атм, нагріваючи розчин поживного середовища до температури 70°C та витримуючи 30 хвилин.

Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі відбувається при температурі $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, постійній аерації та надлишковому в 0,4 атм. протягом 2 діб.

Виробничий біосинтез проводять при температурі $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. В ферментері підтримується тиск 0,4-0,6 атм. Культивування проводять протягом 168 годин, інтенсивно аеруючи середовище .

Через 84 години після початку культивування в середовище не порушуючи асептику вноситься пролін в кількості 0,05 г на 1 л культуральної рідини. Внесення проліну на 84 годинні біосинтезу дозволяє збільшити вихід цільового продукту майже на 25% (з 5900 мкг/л до 7300 мкг/л).

Після завершення виробничого культивування культуральна рідина фільтрується. Лінкоміцин екстрагується з отриманого фільтрату дихлорметаном. Дихлорметановий екстракт випарюється, а отриманий концентрат розчиняється в ефірі. До ефірного розчину лінкоміцину додається метанольний розчин хлороводню, що призводить до випадання кристалів лінкоміцину гідрохлориду. Отримана суспензія центрифугується і висушується. Висушений порошок лінкоміцину гідрохлориду фасується в поліетиленові пакети і відправляється на склад готової продукції.

Також було обрано і розраховано конструкцію реактора-змішувача, що використовується на ділянці підготовки поживного середовища. Номінальний об'єм обраного реактору – 5 м³. Ступінь заповнення – 50%. Реактор оснащений рубашкою та турбінною мішалкою.

Проект був виконаний з урахуванням вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва на основі даних вивчення і аналізу шкідливих виробничих факторів

Отже, можна зробити наступні висновки:

1. Обґрунтовано вибір штаму *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 як продуценту лінкоміцину. Продуктивність штаму складає 7300 мкг/мл культурального середовища за 7 діб культивування. Обрано схему отримання промислового штаму шляхом селекції з використанням індукованого мутагенезу.

2. Запропоновано додати до складу поживного середовища для біосинтезу лінкоміцину пролін в кількості 50 мг/л, що дасть змогу збільшити вихід цільового продукту майже на 25%.

3. За результатами аналізу фізіолого-біохімічних особливостей продуцента встановлені оптимальні умови культивування штаму *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Запропоновано проведення біосинтезу при температурі $t=28$ °C та інтенсивній аерації зі швидкістю подачі повітря $V=1$ л/л·хв.

4. Обрано технологічну схему, що враховує особливості продуценту лінкоміцину. Для реалізації технологічного процесу підбрано відповідне апаратурне оснащення.

5. Розраховано матеріальний баланс стадії підготовки поживного середовища. Показано, що із 2,5 т сировини можна отримати 18,3 кг субстанції лінкоміцину гідрохлориду.

6. Обґрунтовано вибір конструкції реактора-змішувача об'ємом 5 м³, з турбінною мішалкою. Технологічний та конструктивний розрахунки підтверджують надійність та працездатність реактора-змішувача.

7. Проектом передбачені заходи та засоби щодо забезпечення безпечних умов праці та виконання вимог щодо екологічної та пожежної безпеки.