

**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 лізоциму. Дільниця біосинтезу

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

Войтенко Олександра Іванівна
(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

На сьогодні в усьому світі значно зросла розповсюдженість бактеріальних інфекцій. Одним із шляхів вирішення даної проблеми є застосування літичних ферментів широкого спектру дії, зокрема лізоциму. Антимікробні властивості даного ферменту зумовлюють його застосування не тільки в медицині, а й в харчовій промисловості в якості консерванта.

Лізоцим являє собою фермент, який каталізує гідролітичне розщеплення стінки багатьох грампозитивних бактерій. Основою механізму дії лізоциму є порушення цілісності клітинної стінки бактерій внаслідок здатності розщеплювати мурамову кислоту, яка є однією з важливих субодиниць пептидоглікану - складової клітинної стінки грампозитивних бактерій. Лізоцим перешкоджає проникненню антигенів у внутрішнє середовище організму, стимулює фагоцитоз, підсилює функції лімфоцитів, тобто відіграє активну роль в нормальному метаболізмі організму.

У промисловості лізоцим головним чином отримують із білка курячих яєць. Але зі стрімким розвитком біотехнологій найбільший інтерес на сьогодні як продуценти даного ферменту представляють саме мікроорганізми.

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

Метою дипломного проекту розроблення технології виробництва рекомбінантного лізоциму та проектування обладнання для проведення промислового культивування.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Підібрати та охарактеризувати промисловий продуцент рекомбінантного білку лізоциму. Провести аналіз методів створення високопродуктивного промислового штаму-продуценту та навести схему його отримання.

2. Навести характеристику кінцевого продукту виробництва та розглянути біохімічні основи виробництва лізоциму.

3. Підібрати оптимальні умови та склад живильного середовища для проведення процесу біосинтезу.

4. Спроекувати конструкцію ферментеру, яка буде задовольняти параметрам проведення процесу.

5. Навести технологічну та апаратурну схеми для виробництва лізоциму. Скласти матеріальний баланс стадії біосинтезу.

6. Розглянути ризики, які можуть виникнути під час виробництва лізоциму, та передбачити заходи і засоби, направлені на створення на об'єкті здорових, безпечних умов праці та пожежної безпеки.

Лізоцим є ключовим ферментом організму, який виробляється секреторними клітинами слизових оболонок і вважається найбільш важливим бактерицидним білком. Цей фермент був виявлений в слині, сльозах, материнському молоці, травній системі і репродуктивних органах.

Слизові оболонки шлунково-кишкового тракту, кон'юнктиви ока, дихальних шляхів і репродуктивних органів займають велику площу і тому часто піддаються впливу патогенних мікроорганізмів. Слизові оболонки володіють складною імунною системою, важливою ланкою якої є лізоцим.

Лізоцим був виявлений в 1922 році лауреатом Нобелівської премії сером Олександром Флемінгом. Флемінг вперше спостерігали антибактеріальну дію лізоциму, коли розглядав бактеріальні культури носовій слизу пацієнта, що страждає від нежиті.

Лізоцим широко застосовують як в медицині при лікуванні інфекційних захворювань, так і в харчовій промисловості – для попередження бактеріальних заражень продуктів. При комбінуванні з антимікробними препаратами лізоцим потенціює їх дію. У поєднанні із секреторним IgA лізоцим виявляє протизапальну дію, що полягає в нейтралізації кислотних речовин, які утворюються під час запального процесу. Лізоцим стимулює фагоцитоз, що сприяє загоєнню ран й регресу дегенеративних й некротичних процесів.

Лізоцим (мурамідаза) є одним з найдавніших у філогенезі факторів протимікробного захисту. Синтезується макрофагами та моноцитами, надходить у рідинні субстрати – слиз, слину, кров, молоко людини та тварин. Лізоцим також присутній у азурофільних гранулах та специфічних зернах нейтрофілів. За хімічною структурою лізоцим – це катіонний білок, одноланцюговий поліпептид, що складається зі 130 – 150 амінокислотних залишків.

На сьогодні за допомогою рентгеноструктурного аналізу повністю визначена будова цього ферменту, в тому числі й третинна. Молекула лізоциму має форму, близьку до форми еліпсоїда з осями 3,0 і 4,5 нм (рисунок 2.1). Її перетинає коса щілина, у якій відбувається сорбція й гідроліз субстрату (в ній може бути зв'язано 6 глікопіранозних ланок). Щілина має гідрофобну кишеню, де локалізується ацетамідна група N-ацетилглюкозаміну. Важливу роль в механізмі гідролізу глікозидного зв'язку відіграють група C(O)O- залишку аспарагінової кислоти (поляризує зв'язок) і недисоційований карбоксил залишку глютамінової кислоти (донор протона).

Оптимальні умови для формування тілець включень у *E. coli*: температура культивування – 37°C, інтенсивна аерація, додавання ізопропіл-β-D-тіогалактозиду (ІПТГ) до живильного середовища у концентрації 0,1 мМ (фаза експоненційного росту клітин), час культивування після індукції – 3,5 год.

Діюча речовина – очищений рекомбінантний білок лізоциму, вміст якого ≥ 90 %, решта (~10%) – буферні солі ацетат натрію та хлорид натрію. Порошок білого або кремового кольору. Пакування порошку субстанції лізоциму здійснюється у флакони по 0,05, 0,15 або 100 г з кришками згідно з чинною нормативною документацією. Рекомендована температура зберігання 2 - 4°C, при якій термін придатності 2 роки.

Фізико-хімічні характеристики. % білку (UV) ≥ 90 . Молекулярна маса – Mr = 14,3 кДа. Ізоелектрична точка pI = 11,35. Розчинний у воді (10мг/мл). Розчин безбарвний або злегка каламутний. Водні розчини зберігають активність не менше одного місяця при зберіганні при температурі 2–8°C.

Активність лізоциму ≥ 40000 од/мг білку. Залежить від значення рН та іонної сили. Фермент активний в широкому значенні рН – 6,0 – 9,0. При рН = 6,2 максимальна активність спостерігається в більш широкому діапазоні іонної сили (0,02 – 0,100 М), ніж при 9,2 (0,01 – 0,06 М).

Культивування штаму-продуценту починається з оживлення музейної культури та напрацювання посівного матеріалу. Власне біосинтез проводиться при температурі 37°C при аерації протягом 30 год. При досягненні ОГ, що відповідає експоненційній фазі росту мікроорганізмів, проводять індукцію біосинтезу цільового протеїну за допомогою додавання до середовища ІПТГ (ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид).

Виробниче культивування здійснюється у ферментері номінальним об'ємом 100л. Він оснащений барботером для аерації середовища, сорочкою для підтримання заданого температурного режиму, трубою передавлювання й турбінною мішалкою, яка забезпечує інтенсивний тепло- і масообмін. Передбачені всі необхідні штуцери для проведення процесу та підготовки обладнання до роботи.

Після культивування здійснюється збір біомаси центрифугуванням й проводиться одержання цільового продукту очищенням за допомогою афінної хроматографії. Далі проектом передбачено висушування даної субстанції за допомогою ліофільної сушарки з метою полегшення її транспортування та зберігання.

Висушений порошок направляється на стадію дозування у флакони, які пакуються у картонні коробки.

Для клонування конструкції ДНК використовується *Escherichia coli* штам DH5a. Для експресії – *E. coli* BL21 Rosseta Gami-LacZ та вектор pET5a Lyz. Матеріалом для ПЛР Lyz слугує кДНК гемоцитної фазміди креветки

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. В наведеному дипломному проекті розглянуто виробництво субстанції лізоциму – ферменту, який руйнує клітинну стінку бактерій. Дана субстанція використовується для отримання готових лікарських форм.

2. В якості продуцента обрано штам *Escherichia coli* BL21 Rosseta Gami-LacZ з вектором експресії pET5a Lyz, оскільки кишкова паличка вважається універсальним організмом для синтезу чужорідних білків. Даний продуцент отримано генно-інженерним способом після клонування гену лізоциму із креветки за допомогою ПЛР і подальшої трансформації конструкцією ген-вектор клітин *E. coli*.

3. Обрано оптимальні умови для проведення процесу біосинтезу рекомбінантного лізоциму, а саме: температура процесу біосинтезу 37°C, тривалість культивування 30 год на середовищі LB за умов аерації. Обрано ізопропіл-β-D-

тіогалактопіранозид (ШТГ) для індукції утворення тілець включення і накопичення цільового продукту.

4. Наведено технологічну схему, в якій описані стадії допоміжних робіт й стадії основного технологічного процесу, та апаратурну схему виробництва, а також матеріальний баланс стадії біосинтезу.

5. Обґрунтовано конструкцію ферментеру та виконано розрахунок інокулятора для промислового культивування *Escherichia coli* з номінальним об'ємом 0,1м³. Апарат оснащений турбінною мішалкою та барботером. Дана конструкція є універсальною та може використовуватись для виробництва інших рекомбінантних білків.

6. Розглянуто основні вимоги до охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва лізоциму. Передбачено заходи і засоби щодо забезпечення на проектному об'єкті здорових, безпечних умов праці та пожежної безпеки.