

**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

з напрямку підготовки 6.051401 Біотехнологія
(код і назва)

на тему: Технологія виробництва ландоміцину А. Дільниця виділення продукту.

Виконав: студент 4 курсу, групи БТ-21
(шифр групи)

Решетіло Іван Максимович
(прізвище, ім'я, по батькові)

_____ (підпис)

Керівник Тодосійчук Т.С., к.т.н., доц.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

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

_____ (підпис)

Рецензент асистент Зубченко Л.С.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Київ – 2016 року

На сьогоднішній день традиційна медицина має обмежений вибір можливостей лікування онкологічних захворювань. У клінічну практику ввійшло понад 100 протипухлинних засобів, і за останні роки досягнуто певних успіхів в лікарській терапії ряду пухлин. Сьогодні загальноновизнаною є ідея, що кардинально підвищити ефективність антибіотикотерапії можна, лише впровадивши у клініку нові антибіотики тих класів, які раніше не використовувалися, або тих, що використовувалися дуже рідко. Тому пошук нових антибіотиків і модифікація відомих з метою їх удосконалення є одним із головних напрямів сучасної біотехнології.

Від початку ери антибіотикотерапії і донині скринінг бактерій, виділених із різних екотопів, був основним джерелом нових біоактивних речовин, зокрема, антибіотиків. Однак відкриття у наш час антибіотика, що належить до нового хімічного класу або ж є покращеним варіантом уже відомої сполуки, – надзвичайно рідкісна подія. Очевидною є потреба у зміні підходів до пошуку нових природних сполук.

Проблема пошуку нових антибіотичних речовин є однією з найактуальніших у сучасній біотехнології. В першу чергу це зумовлено поширенням явища множинної лікарської резистентності серед мікроорганізмів та ракових клітин. Перспективними в цьому плані є полікетиди, зокрема ті, що належать до групи ангуциклінів. Представниками цих природних сполук є ландоміцини – основні продукти вторинного метаболізму штамів *S. cyanogenus* S136 та *S. globisporus* 1912.

Метою роботи є розробка технології промислового виробництва протипухлинного антибіотику ландоміцину А.

Ландоміцин А – новий протипухлинний антибіотик ангуциклінового ряду, який виявляє виражену протипухлинну активність щодо ракових клітин різного походження та індукує ранній апоптоз у клітинах-мішенях.

Новизною роботи є розробка технології виробництва ландоміцину А у промислових масштабах.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні завдання:

- охарактеризувати продуцент для виробництва протипухлинного антибіотику ландоміцину А;
- провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті;
- розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва;
- скласти матеріальний баланс виробництва;
- обрати технологічну і апаратну схему;
- обґрунтувати вибір конструкції апарату та здійснити його технологічний та конструктивний розрахунки.

У технології використовується штам *Streptomyces cyanogenus* S136, який є надпродуцентом ландоміцину А, що є визначальним при виборі виробничого штаму.

Streptomyces cyanogenus S136 є аеробним, грампозитивним організмом, утворює розгалужений міцелій 0,5-2,0 мкм в діаметрі. Спороносці спіральні та довгі. Зрілі спорові ланцюги можуть містити до 50 спор.

У роботі було розглянуто секвеновану область ДНК з *S.cyanogenus* S136, що охоплює близько 35 кб. Її аналіз узгоджується з можливістю того, що ця ділянка може кодувати всі гени для біосинтезу ландоміцину але абсолютних доказів цього немає, так як всі спроби інактивувати гени кластера шляхом руйнування гена або його заміни були невдалими. Також не є доведеним, що весь кластер біосинтетичних генів ландоміцину був клонований, але після того, як додатково було проведено секвенування 0,7 кб з обох сторін кластера, не було ідентифіковано пов'язаних генів.

На основі даних про генетичну регуляцію біосинтезу, було обрано метод отримання надпродуценту ландоміцину А, на основі введення плазмід, що викликає надекспресію регуляторного гену *lanI*. За результатами досліджень, виявилось, що таким чином можна збільшити вихід ландоміцину у 5 разів, у порівнянні з батьківським штамом.

Технологія виробництва протипухлинного антибіотику ландоміцину А потребує ретельної очистки цільового продукту, яка відбувається в декілька етапів. В даному дипломному проєкті основна увага приділялась першому етапу очистки – екстракції ландоміцину А з культуральної рідини *Streptomyces cyanogenus* S136. Для здійснення цього процесу було спроектовано екстрактор періодичної дії, який являє собою циліндричний вертикальний резервуар об'ємом 10м^3 з верхнім завантажувальним люком і турбінною мішалкою, та за своєю конструкцією є реактором-змішувачем. Екстрагування проводиться у цьому апараті, куди через дозатор подається органічний розчинник етилацетат в об'ємі, рівному до об'єму культуральної рідини в апараті. Процес проходить при інтенсивному перемішуванні механічним перемішувачем із частотою обертання $3,33\text{ с}^{-1}$ протягом 3 годин за температури 25°C . При проведенні процесу необхідно контролювати герметичність апарату та тиск у ньому

Проведені розрахунки підтверджують надійність обраної конструкції та забезпечення відповідного контролю параметрів виробництва. Також було підібрано апаратурну та технологічну схеми лінії виробництва протипухлинного антибіотику ландоміцину А, що враховують особливості технології даного виробництва та включають параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу.

У виробництві знаходяться в обігу шкідливі, пожежо-, вибухонебезпечні, токсичні, горючі речовини і матеріали. Основною складністю є використання етилацетату для екстракції готового продукту, а також подальше очищення відходів від цього розчинника. Тому робота за екстракційним методом вимагає застосування ретельно герметизованого технологічного обладнання, забезпеченого вибухобезпечними електродвигунами, пристосуваннями для боротьби із статичною електрикою, вогнеперегороджувачами на повітряних трубопроводах. Виробничі приміщення повинні бути забезпечені потужною прямоточно-витяжною

механічною вентиляцією, протипожежним водопроводом, спеціальними засобами протипожежної і санітарної профілактики.

Таким чином у дипломному проекті були виконані наступні завдання:

1. На основі визначених фізіолого-біохімічних та біосинтетичних характеристик продуцентів протипухлинних антибіотиків, для використання у проекті виробництва ландоміцину А обрано штам *Streptomyces cyanogenus* S136 (pMO15).
2. Проведено аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, та запропоновано схему отримання рекомбінантного штаму продуценту, методом гібридизації ДНК.
3. Відповідно до визначених фізико-хімічних характеристик продукту для його виділення обрана і розрахована конструкція екстрактору об'ємом 10 м^3 з турбінною мішалкою та частотою обертів $3,33 \text{ с}^{-1}$.
4. Розроблено технологічну і апаратурну схеми для отримання ландоміцину А, підібрано і обґрунтовано багатостадійний метод очистки цільового продукту, який включає в себе екстракцію, випарювання та високоефективну рідинну хроматографію.
5. Технологічні та конструктивні розрахунки підтверджують правильність вибору технологічного обладнання для отримання продукту заданого ступеню чистоту та належної якості.