

**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 авермектину.

Дільниця підготовки посівного матеріалу

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

Сніхівська Маргарита Олександрівна  
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник старш. викл. каф. пром. біотехнології, к.т.н. Тітова Л.О.  
(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 каф. екобіотехнології та біоенергетики

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

Київ – 2016 року

З кожним роком негативні наслідки застосування засобів хімізації, у тому числі для боротьби із шкідниками рослин і тварин та збільшення пестицидного навантаження на агроценози дає все більше негативних наслідків.

Досвід найбільш розвинених країн світу показує, що збереження природних земних ресурсів можливе лише за умови використання речовин природного походження.

Серед них важливе місце посідають антибіотики природного походження, до складу яких входить група речовин – авермектини.

Вони характеризуються широким спектром інсектицидної, акарицидної та нематоцидної активності, володіють нейротоксичною дією на організм шкідників. Норми витрат авермектинів на 1-2 порядки менші, ніж багатьох комерційних інсектицидів, що дозволяє значно знизити пестицидне навантаження на агросистеми.

Великою перевагою даного антибіотику є швидкий розпад після потрапляння в навколишнє середовище, екологічна безпека та нетоксичність щодо теплокровних організмів. Саме тому авермектини є перспективним препаратом для використання не тільки у сільському господарстві, а й у ветеринарії.

Таким чином, налагодження вітчизняного виробництва антипаразитарних препаратів на основі авермектинів для нашої країни є важливим народно-господарським завданням.

Авермектини синтезується всередині клітин організму *Streptomyces avermitilis* та має широкий спектр застосування. Високоочищений продукт у вигляді авермектину В використовується для виробництва івермектину, очищена від домішок суміш всіх авермектинів використовується у ветеринарії, етанольний екстракт авермектину використовується в сільському господарстві для захисту сільськогосподарських культур від шкідників. Для підприємства більш вигідним є виробництво субстанції

авермектину у вигляді біомаси гриба *Streptomyces avermetilis* оскільки вона може бути доочищена та використана в різних галузях промисловості.

Технологія виробництва авермектину потребує вдосконалення, оскільки за останні роки було розроблено багато нових перспективних штамів для синтезу і впровадження їх у промислове виробництво дозволить зробити його дешевшим та продуктивнішим. Тому виконня даного проекту є актуальним.

Дана сполука може бути синтезована хімічно, проте такий спосіб є економічно не вигідним. Тому найчастіше у промисловості використовують мікробіологічні методи отримання авермектину. Продуцентами являються мікроорганізми, які відносяться до роду актиноміцетів *Streptomyces avermitilis*. Варто зауважити, що іншими мікроорганізмами в промислових масштабах дана речовина не виробляється. Тому **актуальність** даної роботи очевидна і полягає у вивченні шляхів отримання авермектину та у створенні штамів, які будуть здатні продукувати авермектин з високим виходом та високою часткою авермектину В, адже він має найбільш виражені антипаразитні властивості а також є вихідною сировиною для отримання івермектину – хімічного, більш сильного та безпечного для навколишнього середовища аналогу.

**Метою** даного дипломного проекту було вдосконалення стадії підготовки посівного матеріалу технології виробництва субстанції авермектину.

Для досягнення мети було поставлено наступні задачі:

1. Обрати перспективний продуцент авермектину.
2. Запропонувати склад поживного середовища на основі фізіолого-біохімічних особливостей продуценту.
3. Обгунтувати вибір схеми отримання продуцента.
4. Обрати технологічну і апаратурну схеми виробництва субстанції авермектину.
5. Виконати розрахунки та обрати конструкцію посівного апарату.

Завданням дипому було вдосконалення ділянки підготовки посівного матеріалу технології виробництва субстанції авермектину.

Продуцентом авермектину обрано штам *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2179 з продуктивністю 1800 мкг/ мл; для даного продуценту було запропоновано поживне середовище для вирощування посівного матеріалу наступного складу: 20 г/л глюкози, 5 г/л дріжджового екстракту, 15 г/л соєвого борошно. Обґрунтовано параметри культивування, що збільшують вихід авермектину: температура - 28°C, тривалість культивування - 36 години, аерація 2 л повітря на 1л середовища за хв, рН 7,0-7,2.

Також було описано структуру авермектину, який являє собою комплекс з восьми близькоспоріднених компонентів: чотирьох мажорних (A<sub>1a</sub>, A<sub>2a</sub>, B<sub>1a</sub>, B<sub>2a</sub>) і чотирьох мінорних (A<sub>1b</sub>, A<sub>2b</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>2b</sub>). За хімічною структурою кожен компонент авермектинового комплексу являє собою макролід з макроциклічного 16-членного лактону, зв'язаного з дицукром діолеандрозою.

Біосинтез авермектину здійснюється у чотири стадії:

- 1) біосинтез початкових одиниць;
- 2) формування незрілих агліконів полікетидсинтазою першого типу (ПКС1);
- 3) постполікетидна модифікація, що включає оксидативну циклізацію, відновлення та/чи метилювання для формування зрілих авермектинових агліконів;
- 4) глікозилювання авермектинових агліконів в діокситимідин - фосфат-L-олеандрою — кінцевий етап синтезу авермектинів.

До складу субстанції авермектину входять всі види авермектинів.

Крім основного діючого початку - авермектину, який забезпечує антипаразитарні властивості препарату, в його склад входять різноманітні внутрішньоклітинні продукти метаболізму продуцента: ліпіди, амінокислоти, жирні кислоти та фітогормони.

Механізм дії авермектинку - нейротоксичного типу. Потрапляючи в організм безхребетних контактно або через кишечник, вони діють на L-глутамін і гамма-аміномасляну кислоту (ГАМК), що призводить до гальмування і блокування передачі нервового імпульсу, внаслідок чого відбувається параліч, а потім і загибель особин багатьох видів комах, кліщів і нематод.

Встановлено, що гени, які беруть участь у біосинтезі авермектину (гени *ave*), подібно генам, необхідним для біосинтезу інших вторинних метаболітів *Streptomyces*, утворюють кластери в хромосомі. Мутації саме в цих генах стимулюють появу надсинтезу цільового продукту всередині клітини *Streptomyces avermitilis*.

Регуляторні фактори і механізми, які беруть участь у виробництві авермектину погано вивчені. Родина TetR транскрипційних регуляторів (РТР) представляє собою велику родину транскрипційних регуляторів у бактерій, які допомагають контролювати такі клітинні процеси, як виробництво антибіотика з них SAV3818 і SAV3703 були описані в роботі, як позитивні регулятори синтезу авермектинів, і SAV151 і SAV7471 в якості негативних регуляторів.

Було виявлено що досліджуваний штам досить чутливий до дії УФ-променів та деяких хімічних мутагенів таких як N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин. Саме ці особливості використовувалися для створення промислового штаму.

За результатами аналізу літератури встановлено, що продуцент який використовувався в даній роботі отриманий методом індукованого мутагенезу з використанням комбінованої обробки ультрафіолетом: довжина хвилі – 257 нм, час опромінення - 210 с та N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином у концентрації 2 мг/мл, протягом 20-30 хв. Отриманий штам мав ефективність у 40 разів вищу за початковий.

Запропоновано технологічну і апаратурну схеми, що враховують особливості продукту. Застосування двостадійного внесення глюкози під час

виробничого біосинтезу, забезпечує зменшення тривалості культивування до 5 діб.

На основ результатів конструктивного розрахунку у якості посівного апарату для культивування продуценту авермектину *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2179 було обрано ерліфтний ферментер з внутрішньою циркуляцією об'ємом 0,63 м<sup>3</sup>, виготовлений з корозійно-стійкої сталі (ферментер ЕВЦ 0,63-1К з каталогу «Гидролизное и ферментационное оборудование»), що забезпечує дотримання усіх параметрів культивування, підтримання необхідної температури, контроль рН, аерацію та перемішування.

Поживне середовище, додаткові компоненти та посівний матеріал подаються у ферментер через штуцери, що розташовані на кришці апарату. Повітря, піднімаючись вгору, проходить крізь культуральну рідину і відводиться через штуцер на кришці ферментеру.

#### ВИСНОВКИ:

В дипломному проекті було вдосконалено ділянку підготовки посівного матеріалу технології виробництва субстанції авермектину.

1. Продуцентом авермектину обрано штам *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2179 з продуктивністю 1800 мкг/1мл етанольного екстракту;

Запропоновано поживне середовище для вирощування посівного матеріалу наступного складу: 20 г/л глюкози, 5 г/л дріжджового екстракту, 15 г/л соєвого борошно. Обґрунтовано параметри культивування, що збільшують вихід авермектину: температура - 28°C, тривалість культивування - 36 години, аерація 2 л повітря на 1л середовища за хв, рН 7,0-7,2.

2. Досліджено генетичну структуру та механізми репресії та індукції синтезу авермектину.

3. За результатами аналізу літератури встановлено, що продуцент отриманий методом індукованого мутагенезу з використанням комбінованої обробки ультрафіолетом: довжина хвилі – 257 нм, час опромінення - 210 с та

N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином у концентрації 2 мг/мл, протягом 20-30 хв. Отриманий штам мав ефективність у 40 разів вищу за початковий штам.

4. Запропоновано технологічну і апаратурну схеми, що враховують особливості продукту. Застосування двостадійного внесення глюкози під час виробничого біосинтезу, забезпечує зменшення тривалості культивування до 5 діб.

5. На основ результатів конструктивного розрахунку обрано ерліфтний посівний апарат 0,63 м<sup>3</sup> для вирощування посівного матеріалу, що забезпечує дотримання усіх параметрів культивування, підтримання необхідної температури, контроль рН, аерацію та перемішування.