

**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 субстанції колістину. Дільниця сушіння

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

Трояновська Людмила Вікторівна
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник старш. викл. каф. пром.біотехнології, к.т.н.

Тітова Лариса Олександрівна
(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

Розробка та вдосконалення технології антибіотиків стабільно не втрачає своєї актуальності з часів відкриття цих біологічно активних речовин. На сьогоднішній день бактерії все частіше проявляють резистентність до нових препаратів, тож справді актуальним є звернути увагу на антибіотики, що були популярні кілька десятиліть тому. Серед них особливо виділяються поліміксини, до яких належить і колістин. Ці препарати діють на грамнегативні мікроорганізми, багато з яких є полірезистентними до інших препаратів.

Технологія виробництва колістину потребує вдосконалення, оскільки більшість досліджень було проведено ще в середині минулого століття, а впровадження сучасних засобів може зробити її більш дешевою, а сам продукт – безпечнішим.

Метою даного дипломного проекту було вдосконалення стадії сушіння технології виробництва субстанції колістину.

Для досягнення мети було поставлено наступні задачі:

1. Обрати перспективний продуцент колістину.
2. Запропонувати склад поживного середовища на основі фізіолого-біохімічних особливостей продуценту.
3. Обґрунтувати вибір схеми отримання продуцента.
4. Обрати технологічну і апаратну схеми виробництва субстанції колістину.
5. Виконати розрахунки сушильного обладнання та обрати конструкцію конструкцію сушилки.

Перший розділ присвячено описанню морфології та фізіолого-біохімічних особливостей продуцента. Продуцент, *B. polymyxa* var *colistinum* визначено як грампозитивні спороутворюючі палички. Продуцент є хемоорганотрофом, факультативним анаеробом, здатним засвоювати азот. Обґрунтовано оптимальний склад поживного середовища та умови культивування.

Поживне середовище містить: 20 г/л глюкози, 2 г/л кукурудзяного екстракту, 0,1 г/л NaCl, 3 г/л крейди. Параметри культивування, що збільшують вихід антибіотику: температура - 28°C, тривалість культивування - 72 години, перемішування - 120 об/хв., аерація 1м³ повітря на 1м³ середовища, рН - 7,0-7,2.

Другий розділ присвячено біохімічним особливостям продуцента. В розділі зазначено, що поліміксин утворюється не паралельно зростанню продукування організму, але починається в той момент, коли ріст майже завершений і триває в стаціонарній фазі до споруляції або відбувається лізис культури. Важливим фактором, що впливає на продукування антибіотику, є рН, буферний склад середовища, температура росту та інтенсивність аерації. Інгібіторами процесу зазначено D-лейцин або D-фенілаланін (0,1 мМ), 8-азагуанін в низьких концентраціях (0,5 мМ). Описано процес синтезу цільового продукту за допомогою нерибосомальної пептид синтетази та включення ряду залишків діаміномасляної кислоти і Na-6-метілоксаноїлу (або ізооктаноїлу) -діаміномасляної кислоти (MOA-ДАМ або LOA-ДАМ) на N-кінець пептиду. Описано методи очистки продукту а допомогою катіонообмінних смол та механізми впливу колістину на грамнегативні організми. Всі поліміксини впливають на цитоплазматичну мембрану бактеріальної клітини, взаємодіючи з фосфоліпідами. Позитивно заряджений поліпептид електростатично зв'язується з аніонними ділянками мембранних фосфоліпідів, витісняючи катіони Mg, що забезпечують стабільність мембрани. За характером дії нагадують катіонні детергенти. Одночасно у внутрішні гідрофобні ділянки мембрани вбудовується боковий ланцюг жирної кислоти. Структура мембрани порушується (відбувається втрата катіонів K) Пошкодження структури мембрани при електронно мікроскопічному аналізі виглядають як вип'ячування у вигляді бульбашок, внаслідок збільшення площі її поверхні. Дія антибіотика призводить до зміни мембранної проникності як для внутрішньо-, так і позаклітинних компонентів.

Третій розділ присвячено генетиці продуцента, а також способу отримання штаму *B.polymuxa* NRRL B-719, що продукує наш цільовий продукт. Проведено вирівнювання геномів різних штамів *B.polymuxa*, в наслідок якого зроблено висновки, що різні штами *B.polymuxa* мають дуже схожу структуру геному, отже за наявності генетичної карти або нуклеотидної послідовності принаймні одного з них можна приблизно уявити генетичну структуру інших штамів. На основі літературних даних зроблено висновок, що кластер генів NRPS є потенційним генним кластером, відповідальним за синтез поліміксинів. Ген складається з п'яти ділянок: *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, та *ptxE*. Серед цих ділянок *ptxC*, *ptxD*, швидше за все, кодують білки мембранного транспорту, тоді як *ptxA*, *ptxB*, та *ptxE* кодують поліміксин синтетазу.

Продуценти поліміксинів загалом можна отримувати методами індукованого мутагенезу, як, наприклад, обробка ультрафіолетом, а також в дослідженнях використовуються методи генної інженерії. Зустрічаються випадки використання в дослідженнях транспозиції (зокрема для визначення інших антимікробних речовин, продукуємих продуцентом). Відомо використання методу під назвою ПЦР-націлений мутагенез – схема порушення цілосності гену, вперше використана для визначення продуценту фузаріцидину. У даному випадку використовувалася плазміда *E.coli* pUZ8002, що здатна була перенести певну косміду. Метод згадується в контексті дослідження впливу різних генів *B.polymuxa* на створення цільового продукту. Наш штам було отримано шляхом опромінення УФ протягом 2 хвилин за довжини хвилі 257 нм.

Четвертий розділ присвячено викладенню технологічного процесу, опису сировини, матеріалів, напівпродуктів. У розділі також наведено матеріальний баланс стадії сушіння та перелік контрольних точок. Також приведена характеристика готового продукту – субстанції колістину та приклад препарату, який може бути створено на її основі.

П'ятий розділ обґрунтовує обрану конструкцію сушилки, містить матеріальний та тепловий розрахунок для неї, а також розрахунки допоміжного обладнання (а саме калорифера та вентилятора). Також у розділі наведено вимоги до техніки безпеки, охорони праці та навколишнього середовища.

Обрана розпилювальна сушилка дозволяє нам підвищити швидкість сушіння продукту, забезпечує збереження більшої частини субстанції у випадку технічних збоїв (постраждає лише та частина продукту, що сушиться в камері, але не вся партія). Також використання розпилювальної сушарки означає зменшення втрат. М'який режим сушки робить її придатною для обробки навіть термолабільних матеріалів, а відсутність контакту матеріалу зі стінкою дозволяє продовжити термін роботи апарату та запобігти корозії. Сушарка, обрана для розпилювання, оснащена відцентровим дисковим розпилювачем. Відцентровий дисковий розпилювач є хорошим вибором для даного процесу, адже дозволяє створити умови розпилення рідини для сушіння розчинів у розпилювальних сушарках. Внаслідок роботи такого розпилювача при пропусканні розчину через диск розпилюючої голівки, який обертається з великою частотою, частинки рідини перетворюються у мілкі краплі, тому збільшується активна поверхня рідини та забезпечується її швидке випаровування. Цей спосіб має ряд переваг перед розпилюванням під тиском та пневматичним за допомогою сопла:

1. Більша надійність,
2. Незначна небезпека засмічення,
3. Можливість зміни швидкості подачі, частоти обертання диску, а відповідно і розмірів часток без суттєвого впливу на інші параметри.

Крім того, центробіжний дисковий розпилювач підходить майже для всіх розчинів, включаючи пасти і суспензії. З умов техніки безпеки та екології висушений матеріал не контактує із зовнішнім середовищем. При виході з сушильної камери відпрацьоване повітря через недостатнє очищення повертається у повітохід, по якому подається до батареї циклонів, і тільки

після цього викидається в атмосферу. З умов техніки безпеки сушильна камера обладнана ізоляцією, що забезпечує температуру зовнішньої стінки +40°C

В якості основних заходів техніки безпеки виділено наступні:

- максимальна герметизація устаткування і механізація процесів;
- застосування індивідуальних засобів захисту (комбінезони, шоломи-капюшони, халати, рукавички, косинки, респіратори);
- щоденний теплий душ після роботи;
- обезпилювання, стерилізація робочого одягу;
- миття рук і полоскання рота перед прийомом їжі;
- щорічні медичні огляди

У мікробіологічних виробництвах технологічні викиди відбуваються на таких ділянках виробництва: викиди з ферментерів та гідролізних апаратів, викиди з розпилювальних сушарок, газові викиди під час пропарювання і продування обладнання й матеріалопроводів, вентиляційні викиди. Вимоги до охорони навколишнього середовища включають контроль за викидами, особливо за рідкими відходами, забезпечуючи максимальне їх знезараження та нейтралізацію.

В дипломному проекті було вдосконалено ділянку сушіння технології виробництва субстанції колістину.

1. Обрано продуцентом колістину штам *V.polimuxa* NRRL В-719 з продуктивністю 9000 ОД/мг.

2. Запропоновано поживне середовище наступного складу: 20 г/л глюкози, 2 г/л кукурудзяного екстракту, 0,1 г/л NaCl, 3 г/л крейди. Обґрунтовано параметри культивування, що збільшують вихід антибіотику: температура - 28°C, тривалість культивування - 72 години, перемішування - 120 об/хв., аерація 1м3 повітря на 1м3 середовища, рН - 7,0-7,2.

3. За результатами аналізу патентних даних встановлено, що продуцент отриманий методом індукованого мутагенезу з використанням обробки ультрафіолетом: довжина хвилі – 257 нм, потужність лампи 2375 МГц,

тривалість обробки – 2 хв. Отриманий штамп мав антибіотичну ефективність у 5 разів вищу за початкову.

4. Запропоновано технологічну і апаратурну схеми, що враховують особливості продукту.

5. На основ результатів конструктивного розрахунку обрано розпилувальну сушарку продуктивністю по випареній волозі 200 кг/год для сушіння субстанції колістину. Використання такої конструкції сушарки дає змогу зменшити тривалість сушіння до 6 годин та зменшує втрати продукту.