

**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 лакази. Дільниця біосинтезу

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

Тураєва Галина Рустамівна  
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник доц., к.т.н. Клечак Інна Рішардівна  
(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 доц., к.т.н. Зубченко  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

## **Актуальність проекту**

Фермент лаказа відносяться до класу оксидаз і є лігнінолітичним ферментом, що широко поширений в природі. Завдяки високій стабільності та широкій субстратній специфічності застосування лаказ є перспективним в багатьох галузях промисловості: у виробництві деревно-волокнистих плит, у тонкому органічному синтезі, в текстильній промисловості, у харчовій промисловості та інших областях.

Проте промислова технологія лакази в нашій країні поки відсутня. У зв'язку з цим робота по створенню технології виробництва даного ферменту є актуальною.

## **Мета**

Метою дипломної роботи є розробка технології отримання лакази в промислових масштабах.

## **Завдання**

Для виконання мети були поставлені наступні завдання:

- проаналізувати основні продуценти лакази та обрати продуцент з максимальною продуктивністю;
- визначити біохімічні властивості кінцевого продукту та методи його очищення;
- запропонувати метод створення високопродуктивного промислового продуценту;
- розробити технологічну схему промислового виробництва лакази методом глибинного культивування;
- провести технологічний та конструктивний розрахунки апарату для біосинтезу лакази та розробити апаратурну схему отримання сухого ферментного препарату лакази.

## **Розділ 1. Характеристика біологічного агента**

Лаказа широко поширена у вищих рослин і грибів, і також була знайдена у комах та бактерій. У великій кількості цей фермент присутній в грибах білої гнилі, які беруть участь в деградації лігніну.

Проте, на сьогоднішній день все більшого розповсюдження набуває метод отримання гетерологічних ферментів, що спрощує умови культивування.

В даній роботі для отримання цільового продукту використовується рекомбінантний штам *Penicillium canescens* PCA, що несе ген лакази базидіального гриба *Trametes hirsuta*.

*P. canescens* відноситься до відділу *Deuteromycota* (недосконалі гриби), клас *Hyphomycetes*, порядок *Hyphomycetales*, родина *Mucedinaceae*, до роду *Penicillium*.

Міцелій безбарвний, багатоклітинний, мутовчато розгалужений. Від гіф відходять прямостоячі конідіеносці, розгалужені на кінці. Розмноження відбувається лише за допомогою спор.

*Penicillium canescens* за своєю природою є мезофілом, оптимальна температура росту 29°C. Оптимальний рН середовища для зростання становить 4.1-5.8.

Джерело вуглецю - глюкоза. Джерела азоту - різні неорганічні солі амонію (аміак і сульфат амонію). Мінеральні добавки - фосфат калію, сульфат магнію, хлорид натрію, сульфат заліза, сульфат марганцю, хлорид кальцію тощо. Вітаміни - тіамін, дріжджовий екстракт і т.п.

За відношенням до кисню – аероб, тип енергетичного метаболізму – дихання.

## **Розділ 2. Біохімічні основи виробництва**

Лаказа (п-дифенол: кисень оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) фермент, що каталізує окислення дифенолів, амінофенолів, поліфенолів, поліамінів, а також деяких неорганічних іонів з одночасним відновленням молекулярного кисню до води. До складу молекули лакази входять 4 іона міді, що знаходяться в різному оточенні.

Рекомбінантна лаказа, виділена зі штаму *Penicillium canescens* PCA-10 має молекулярну масу близько 72 кДа, вуглеводна частина становить приблизно 16%.

Готовий біотехнологічний препарат лакази являє собою дрібний однорідний порошок блідо-коричневого кольору із вмістом вологи не більше 6%. Чистота препарату 99%. Вміст свинцю не більше 5 мг/кг. Кількість мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів не перевищує  $5 \cdot 10^4$  КУО/г. Бактерії групи кишкових паличок та патогенні мікроорганізми відсутні.

### **Розділ 3. Методи отримання промислових продуцентів**

В даній роботі відбулось конструювання рекомбінантної плазмиди *pBGlac*, що містить ген, який кодує синтез лакази лігнінолітичного гриба *Trametes hirsuta*, і штаму *Penicillium canescens PCA-10 (niaD<sup>-</sup>) / BGlac*, що забезпечує синтез і продукцію в розчинній формі ферменту лакази гриба *Trametes hirsuta*.

Фрагмент ДНК з геном лакази ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням ДНК *Thrametes hirsuta*.

Продукти реакції розділяли за допомогою гель-електрофорезу в агарозі. Фрагмент ДНК виділяли з агарози та очищали спеціальними речовинами.

Процедури клонування у плазмиду виконували за стандартними методиками. Отримана в результаті плазмиди була названа *pBGlac*.

Для трансформації міцеліальних грибів використовували штаму *P. canescens PCA-10 (niaD<sup>-</sup>)*, яку культивували 16 годин при 29°C на повному поживному середовищі.

Проводили протопластування клітин і висівали протопласти у верхньому шарі на щільне селективне мінімальне середовище.

Протопласти трансформували сумішшю ДНК плазмиди *pBGlac* з геном лакази *Thrametes hirsuta*.

Відбирали трансформанти: клони *P. canescens*, названі *P. canescens PCA-10 (niaD<sup>-</sup>)/BGlac*.

Для відбору клонів, які продукують лаказу, проводилося їх ферментаційне культивування і тестування культуральних рідин на наявність відповідної ферментативної активності.

#### Розділ 4. Технологічна частина

Процес виробництва лакази складається з санітарної підготовки виробництва, підготовки сировини та матеріалів, безпосереднього технологічного процесу, пакування та маркування, та знешкодження відходів.

Санітарна підготовка виробництва включає наступні операції: підготовка персоналу та технологічного одягу, підготовка миючих засобів, підготовку виробничих приміщень та обладнання, очищення повітря, що подається у виробничі приміщення та у ферментер, підготовка води.

Підготовка сировини та матеріалів включає стадію підготовки поживного середовища (дозування та змішування компонентів, стерилізація) та стадію підготовки посівного матеріалу (отримання продуценту, вирощування у пробірках, колбах та посівному апараті).

Процес ферментації відбувається глибинним методом у ферментері ємністю 3,2 м<sup>3</sup> при помірному перемішуванні (100 об/хв.) та аерацією (1 хв<sup>-1</sup>).

Оптимальні умови процесу ферментації:

|                 |   |
|-----------------|---|
| Час             | 96 год;   |
| Температура     | 29°C;   |
| pH середовища   | 4,5;  |
| Ступінь аерації | 1 (1 м <sup>3</sup> повітря на 1 м <sup>3</sup> середовища в 1 хв); |
| Перемішування   | 100 об/хв.;   |

Тиск у ферментері підтримується на рівні 0,05 – 0,2 кгс/см<sup>2</sup>.

Відділення культуральної рідини від біомаси відбувається за допомогою коміркового барабанного вакуум-фільтру безперервної дії із зовнішньою поверхнею фільтрування.

Далі культуральна рідина проходить стадію концентрування за допомогою ультрафільтрації, після чого фермент висолюється додаванням сульфату амонію. Осад відділяють центрифугуванням, після чого висушують у сублимаційній сушарці.

## Розділ 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу

### Висновки

1. В якості промислового продуценту лакази обрано штам *Penicillium canescens* PCA-10.
2. З метою надання продуценту здатності синтезу лакази було запропоновано схему його отримання шляхом генетичної трансформації плазмідною, що містить ген лакази *Trametes hirsuta*.
3. Розроблено технологічну схему отримання сухого ферментного препарату, що включає допоміжні роботи, виробниче культивування, відділення біомаси, концентрування та осадження ферменту, ліофільне висушування ферментного препарату, пакування та маркування продукту, знешкодження відходів.
4. Розроблено апаратурну схему для реалізації технологічного процесу, що включає пробірки, колби та посівний апарат для підготовки посівного матеріалу, ферментер, барабанний вакуум-фільтр, фільтраційні установки для ультрафільтрації, реактори-змішувачі, центрифугу, сублимаційну сушарку та загальнозаводське обладнання (насоси, фільтри, дозатор).
5. Розраховано ферментер для проведення технологічного процесу об'ємом 3,2 м<sup>3</sup>, який оснащений лопатевою мішалкою, барботером та рубашкою. Розрахований апарат дозволяє підтримувати всі необхідні параметри для ведення технологічного процесу.