

**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 протеїнази. Дільниця підготовки посівного матеріалу

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

Зайченко Тетяна Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник доц., к.б.н. Жолнер Лілія Григорівна
(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.б.н. Ситник О.І.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Київ – 2016 року

Актуальність проекту зумовлена тим, що в умовах сучасності виробництво ферментних препаратів та їх застосування знайшло широке розповсюдження. Зокрема значне місце у їх виробництві посідають протеолітичні ферменти.

Об'єктом проектування у даній роботі є виробництво протеїнази з фібринолітичною дією. Ферменти з фібринолітичною активністю, виділені з мікроорганізмів, привертають увагу дослідників своєю низькою собівартістю та відсутністю небажаних побічних дій. Мікробні фібринолітичні ферменти мають особливе значення у виробництві лікарських засобів. Вони здатні безпосередньо руйнувати фібрин в кров'яних згустках тромбів або активувати плазміноген, який завдяки цьому набуває здатність розщеплювати фібрин. Такі властивості фібринолітичних ферментів можуть бути успішно використані при тромболітичній терапії.

У зв'язку з надзвичайним попитом на протеолітичні ферменти метою нашого проекту була розробка технології виробництва протеїнази з фібринолітичною активністю.

Для досягнення поставленої мети було необхідним вирішення таких завдань:

1. Обрати промисловий штам-продуцент для виробництва протеїнази з фібринолітичною дією;
2. Вивчити морфолого-цитологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки обраного штаму-продуценту за літературними даними;
3. Визначити метод та побудувати схему отримання високопродуктивного штаму-продуценту;
4. Дати характеристику кінцевому продукту виробництва за його компонентним складом та механізмом впливу на біохімічні процеси;
5. Створити технологічну та апаратурну схеми виробництва протеїнази, розрахувати матеріальний баланс виробництва;
6. Підібрати, обґрунтувати та розрахувати посівний апарат для культивування продуценту протеїнази з фібринолітичною дією.

Вибір штаму-продуценту був зумовлений тим, що одними із найактивніших продуцентів фібринолітичних ферментів є штами мікроорганізму *Bacillus subtilis*, виділені з різноманітних джерел: ґрунту, морської та прісної води, ферментованих харчових продуктів. У даній роботі в якості продуцента обраний штам *Bacillus subtilis* A26, виділений з морської води.

У роботі наведені морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні ознаки культури *Bacillus subtilis* та описане їх поширення в природі.

У даній роботі у якості цільового продукту виробництва обрано субтилізин BSF1 і надано його характеристику. Він є ферментом класу гідролаз, а саме сериновою едопептидазою. Оптимум його ферментативної активності спостерігається при рН 9,0 і температурі 60 °С. Очищений фермент характеризується високою фібринолітичною активністю.

Дана сполука синтезується у клітині відповідно до схеми біосинтезу білків. Вона, як і інші позаклітинні пептидази представників роду *Bacillus*, синтезується в цитоплазмі як препроензим і перетворюється у зрілий ензим уже поза клітиною завдяки автопроцесингу шляхом обмеженого протеолізу.

В роботі підкреслюється, що у процесі реалізації технології має бути отриманий ферментний препарат субтилізин BSF1 з індексом Г20х. Препарат в основному містить комплекс протеолітичних ферментів, з яких основним компонентом є серинова едопептидаза. Вологість препарату має становити не більше 8%. Мікробна чистота препаратів з індексом Г20х регламентується на рівні не більше 100 колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 г. Не допускається наявність патогенної мікрофлори.

У роботі наводиться перелік методів очистки цільового продукту, який включає в себе:

- відділення біомаси від культуральної рідини сепаруванням;
- відділення біомаси від культуральної рідини фільтруванням;
- концентрування ферментів упарюванням;

- концентрування ферментів осадженням;
- очистка ферменту ультрафільтрацією;
- діаліз;
- виморожування;
- хроматографія (гель- фільтрація, адсорбційна, розподільна, афінна та йонообмінна);
- висушування ферменту (у розпилювальній сушарці або під вакуумом у сублімаційній сушарці).

Наведена характеристика кожного з методів та підкреслені їх переваги й недоліки.

Надається механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси у вигляді схеми розщеплення білків згідно зі схемою каталізу серинових пептидаз.

У роботі для виду *Bacillus subtilis* представлена генетична карта. Геном організму даного виду представлений кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК розміром 4214814 пар основ і містить 5279 генів, з яких 5163 кодують білки. Оскільки у літературі відсутні дані щодо особливостей експресії гену *bsf1*, який кодує синтез субтилізину BSF1, у роботі розглядається загальний механізм експресії генів.

Визначено, що штам-продуцент *Bacillus subtilis* A26 був отриманий виділенням з морської води. Автори Agrebi, Haddar, Hmidet, Jellouli, Manni, Nasri (2008) провели селекційну роботу з даною культурою, в основі якої лежав природній добір. Авторами було здійснено чистку та стабілізацію культури. Схема даного процесу наведена у роботі.

Інші методи отримання промислових продуцентів (гібридизація, регуляція метаболізму, методи клітинної та генної інженерії) для даного штаму не використовувались.

Для кінцевої продукції виробництва (ферментного препарату субтилізину BSF1 Г20х) надано характеристику (галузь використання,

фізико-хімічні властивості, особливості упакування, маркування, транспортування та зберігання продукту).

Для кожного виду сировини, матеріалів та напівпродуктів наводиться характеристика за нормативними документами.

У роботі представлений опис технологічного процесу, який складається з наступних стадій:

- ДР1. Санітарна підготовка виробництва
- ДР2. Підготовка повітря
- ДР3. Підготовка води
- ДР4. Підготовка поживного середовища
- ДР5. Підготовка посівного матеріалу
- ТП6. Виробничий біосинтез
- ТП7. Відділення біомаси сепаруванням
- ТП8. Концентрування розчину випарюванням
- ТП9. Осадження ферменту з розчину
- ТП10. Сорбційна очистка ферменту
- ТП11. Концентрування розчину ультрафільтрацією
- ТП12. Вакуумна сушка ферменту
- ТП13. Стандартизація продукту
- ПМВ14. Фасування та маркування продукції
- ПВ15. Переробка відходів
- ЗВ16. Знешкодження відходів

У роботі наведений матеріальний баланс виробництва, який охоплює стадії від підготовки поживного середовища до фасування та маркування продукції. Також для усього процесу виробництва надається перелік контрольних точок.

Згідно із запропонованою технологією виробництва протеїнази з фібринолітичною активністю створено технологічну та апаратурну схеми для реалізації процесу виробництва.

Оскільки у темі роботи фігурує дільниця підготовки посівного матеріалу, її проектуванню приділена особлива увага. Зокрема для цієї дільниці обрано посівний апарат ерліфтного типу з внутрішньою циркуляцією об'ємом 0,63 м³, виготовлений з корозійно-стійкої сталі. Вибір даної конструкції був обґрунтований і особливості апарату наведені, зокрема і технічна характеристика.

У роботі здійснено розрахунок посівного апарату, який включає в себе:

- конструктивний розрахунок;
- розрахунок газорозподільчого пристрою;
- складання теплового балансу і визначення теплового навантаження апарату;
- визначення поверхні теплообміну теплообмінних пристроїв апарату.

Для обслуговування посівного апарату підібране загальнозаводське обладнання, а саме насоси для подачі та відведення теплоносіїв, поживного середовища, культуральної рідини, компресор для подачі повітря для аерації, індивідуальний фільтр тонкої очистки повітря для аерації.

У роботі сформульовані вимоги до охорони праці та навколишнього середовища. Приділена увага експлуатації заводів ферментних препаратів, техніці безпеки з використання типового обладнання, технічним і санітарним засобам боротьби з шкідливими чинниками.

За результатами проведеної роботи сформульовано такі висновки:

1. Для одержання цільового продукту препарату протеолітичного ферменту – субтилізину BSF1 Г20х було обрано штам *Bacillus subtilis* A26.
2. З метою збереження продуктивності продуценту було запропоновано його отримання шляхом природного відбору (здійснюючи чистку та стабілізацію культури).
3. Було запропоновано технологічну схему виробництва протеїнази субтилізину BSF1 Г20х, яка складається з допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, води, поживного середовища,

посівного матеріалу) і стадій основного технологічного процесу (виробничий біосинтез, концентрування і очистка продукту, фасування і маркування продукту).

4. На основі технологічної схеми виробництва препарату протеолітичного ферменту було розроблено апаратну схему виробництва для реалізації технологічного процесу.

5. Було розраховано матеріальний баланс виробництва субтилізину BSF1 Г20х.

6. Було розраховано посівний апарат для підготовки посівного матеріалу номінальним об'ємом $0,63 \text{ м}^3$. Його габаритні розміри становлять: довжина 1060 мм, ширина 1025 мм, висота 1775 мм. Апарат обладнаний штуцерами для входу та виходу потоків речовин (теплоносіїв, продукту, поживного середовища, посівного матеріалу) та миючою голівкою.