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

зі спеціальності 6.051401 Біотехнологія
(код та назва напряму підготовки або спеціальності)

на тему: Технологія виробництва рекомбінантногоінсуліну. Дільниця виробничого біосинтезу.

Виконав: студент 4 курсу, групи БТ-11
(шифр групи)

Кузнець Дмитро Олегович
(прізвище, ім’я, по батькові)

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

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

Розділ 6 доц., к.т.н. Орленко А.Т.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

Рецензент старший викладач, к.т.н. Щурська К.О.
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

Інсулін - єдиний цукрознижувальний гормон, регулює обмін вуглеводів та білків, підсилює транспорт амінокислот крізь мембрани та, в загальному, бере участь у 22 реакціях обміну речовин. Порушення секреції даного гормону спричинює розвиток складного захворювання – цукрового діабету. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, поширеність цукрового діабету серед дорослого населення в більшості регіонів світу становить 2-5 % і, незважаючи на очевидний прогрес в медицини, є тенденція збільшення кількості хворих майже в два рази кожні 15 років.

До теперішнього часу радикальним, а в більшості випадків і єдиним засобом для підтримання життя і працездатності хворих на цукровий діабет, є комплексний прийом анти діабетичних препаратів, діючою речовиною в яких виступає, власне, штучний гормон інсулін.

Нині більшість наукових досліджень щодо отримання виробництва штучного рекомбінантного інсуліну людини спрямовані на розробку та впровадження методів генної інженерії.

Метою даного дипломного проекту є створення способу отримання рекомбінантного інсуліну людини, який гарантує збільшення виходу та якості кінцевого продукту.

В основу дипломної роботи поставлена задача підвищення ефективності отримання цільового продукту, скорочення технологічного процесу, удосконалення технології руйнування бактеріальних клітин і відмивання тілець включення, а також оптимізації процесу рефолдингу, удосконалення технології концентрації та очищення.

У даному проекті продуцентом обрано *Escherichiacoli*JM109/pK8-proins, який отримують генетичним конструюванням invitro, здатний утворювати у вигляді тілець включень попередник інсуліну – проінсулін.Клітини *E.coli* паличкоподібні, із злегка закругленими кінцями, 1,1-1,5 х 2,0-6,0 мкм, поодинокі або в парах Характерною рисою є наявність капсули. Грамнегативні. Клітини рухомі, мають ряд перитрихіально розташованих джгутиків. Є факультативними анаеробами, яким притаманний

бродильний і дихальний типи метаболізму. Постійним середовищем існування є шлунково-кишковий тракт людини(106-108 КУО/г вмісту товстої кишки),проте досить стійка і зовнішньому середовищі, наприклад у ґрунті.

Кінцевим продуктом виробництва являється ліофільно висушений білок, розфасований по 20 г у 200 млскляні флакони, який використовується у якості АФІ при виробництві антидіабетичних ін'єкційних препаратів.

Досліджено характер росту *E. coli* на щільних поживних середовищах (МПА) та рідких поживних середовищах (МПБ).Вказано особливості росту на елективних середовищах (Ендо, Плоскірєва, Левіна). Для максимально ефективного накопичення біомаси штамом-продуцентом*Esherichiacoli*JM109/pK8-proins обрано збагаченепоживне середовище LB.

Було також розроблено технологічну схему процесу виробництва рекомбінантного інсуліну представлена. Для реалізації технологічної схеми запропонована апаратурна схема виробництва.

Технологія включає у себе допоміжні роботи, стадії основного технологічного процесу, пакування, маркування готової продукції та переробку й знешкодження відходів.

Допоміжні роботи передбачають приготування води очищеної, санітарну підготовку виробництва (підготовку миючих та дезінфікуючих розчинів, підготовку персоналу, підготовку виробничих приміщень, обладнання та комунікацій, технологічного одягу), підготовку повітря класу D, C та B, робочих розчинів, піногасника, посуду та поживних середовищ. Завершуються допоміжні роботи відновленням музейної культури та інкубації її в шейкері при 37 °C.

Основні етапи технологічного процесу починаються з вирощування посівного матеріалу в інокуляторі.Вторинна маточна культура напрацьовується в інокуляторі об'ємом 50 літрів, з аерацією та інтенсивним перемішуванням при концентрації розчиненого кисню не вище 20 %

протягом 5-7 годин при температурі 37 °С. Далі інокулюм перекачується до виробничого ферментера.

Виробничий біосинтез відбувається у промисловому ферментері, об’ємом 250 л. У нього попередньо вносять поживне середовище та стерилізують гострою парою Після внесення поживного середовища в ферментер, його перемішують, насичуючи киснем шляхом введення стерильного повітря через барботер та вносять інокулюм.Культивування проводять при температурі 37 ºС. Глюкозавикористовується як джереловуглецю. Надлишковий тиск підтримують автоматично за допомогою автоматичного регулятора. Перемішуючий пристрій працює постійно. Частота обертання мішалки 250 об/хв. Як тільки концентрація клітин досягає OD_{600} 30, вводять стерильний розчин індуктора lac-оперону (IPTG) та продовжують культивування протягом 6 год, до досягнення концентрація клітин приблизно 50 при OD_{600}. Наприкінці ферментації культуральну рідину подають до теплообмінника і охолоджують.

Далі здійснюють відділення кл біомаси, потім - очистку тілець включень. Після даного процесу проводять рефолдинг третинної структури проінсуліну шляхом промивання в буфері. Наступним процесом виступає ферментативна конверсія проінсуліну до активної форми – інсуліну. Решта стадій – очистка, концентрування та висушування до готової формиінсуліну. Важливо зауважити, що очистка проводиться іонообмінною хроматографією та ультрафільтрацією, далі очищений та концентрований розчин інсуліну розливають у флакони, висушують до порошкоподібної маси в ліофільній сушарці, закупорюють та обкатують флакони, і пакують у групову тару – контейнери пластикові.

Готовий продукт має наступні характеристики:

1) зовнішній вигляд - порошок білого кольору без сторонніх домішок та неоднорідностей;
2) активність 27,5 МО/мг;
3) масова частка вологи не більше 2 %.

Відповідно до завдання проекту було розглянуто дільницю біосинтезу цільового продукту. Розраховано посівний апарат для культивування штаму-продуценту *E. coli*JM109/pK8-proins.

Об’єм, $м^3$	0,25
Коефіцієнт заповнення	0,6

Апарат має перемішуючий пристрій, що представлений турбінною мішалкою, а також барботером. В якості теплоносія використовується вода питна охолоджена до 19 °С, що подається в сорочку апарату та забезпечує оптимальні умови вирощування посівного матеріалу.

Апарат має всі необхідні штуцери для проведення технологічного процесу, а також для підготовки апарату до роботи.

Висновки:

1. Розглянуто детальну характеристику виду *Escherichiacoli* в цілому та конкретного штаму-продуценту проінсуліну - *Escherichiacoli*JM109/pK8-proins, обґрунтовано його вибір для реалізації технології виробництва рекомбінантного інсуліну. Обрано схему отримання промислового штаму шляхом генетичного конструювання invitro.

2. Запропоновано LB середовище для культивування, додатково збагачене тіаміном, рядом мікроелементів та з додаванням антибіотику канаміцину.

3. За результатами досліджень фізіологічних та біохімічних особливостей продуценту *Escherichiacoli*JM109/pK8-proins, встановлені оптимальні умови культивування у посівному апараті. Запропоновано проведення біосинтезу при температурі t = 37 °С та інтенсивній аерації зі швидкістю подачі повітря 600 $м^3$/год на протязі 12 годин. При цьому накопичення внутрішньоклітинних включень гібридного білку спостерігається у 90-95 % клітин.

4. Обрано технологічну схему, що враховує особливості продуценту проінсуліну. Для реалізації технологічного процесу підібрано відповідне апаратурне оснащення.

5. Розраховано матеріальний баланс стадії підготовки поживного середовища та культивування. Показано, що із 182,93 л культуральної рідини наприкінці технологічного процесу можна отримати близько 800 г субстанції рекомбінантного інсуліну.

6. Обґрунтовано вибір конструкції посівного апарату об’ємом 250 л, з турбінною мішалкою. Технологічний та конструктивний розрахунки підтверджують надійність та працездатність ферментеру.

Проект виконано згідно вимог охорони праці, пожежної безпеки та екології. В дипломній роботі на основі аналізу шкідливих, небезпечних факторів передбачені заходи і засоби щодо створення на проектному об’єкті здорових безпечних умов праці.

Впровадження даної технології виробництва рекомбінантного інсуліну є доцільною та перспективною. Технологію розроблено згідно вимог cGMPFDA, що дозволяє ефективно та безпечно реалізовувати її в промисловому виробництві.