

**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 напрямку підготовки або спеціальності)

на тему: Технологія виробництва рекомбінантного білку НВсоговірусу гепатиту В. Дільниця приготування поживного середовища

Виконала: студентка 4 курсу, групи БТ-11  
(шифр групи)

Венгловська Анна Сергіївна  
(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник ст.викл. Ліновицька Віта Михайлівна  
(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 ст.викл. к.т.н. Жукова В.С.  
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

Гепатит В залишається однією із самих поширених інфекційних хвороб і є важливою проблемою охорони здоров'я багатьох країн світу. За оцінками експертів МОЗ, у всьому світі вірусом гепатиту В (ВГВ) інфіковано більше 2 млрд. людей, а 1,5-2,0 млн. людей помирає від захворювань печінки, викликаних цією інфекцією. Тому актуальність виробництва даного продукту пов'язана з потребою в діагностичних засобах, які дозволяють визначити стадію захворювання, наявність хронічного гепатиту В, а також стан імунітету до захворювання гепатитом В.

Одним із компонентів тест-систем, призначених для аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність IgG та IgM антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) методом імуноферментного аналізу є білок HBscore.

Тому метою роботи є розробка технології виробництва рекомбінантного білку HBscore вірусу гепатиту В.

Завдання для дипломного проекту:

1. Підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва рекомбінантного білка.
2. Провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті.
3. Розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва.
4. Скласти матеріальний баланс виробництва, обрати технологічну і апаратурну схему.
5. Обґрунтувати вибір конструкції апарату, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.
6. Провести аналіз шкідливих та небезпечних факторів виробництва, методи їх попередження.

Готовий продукт – розчин рекомбінантного білку HBscore з ступенем чистоти 98% у флаконах по 10 мл/см<sup>3</sup> або 15 мл/см<sup>3</sup>.

Продуцентом обрано штам *Escherichiacoli* K12, модифікований шляхом плазмідної трансформації, оскільки отримання білку безпосередньо з вірусів складне і потребує особливих умов щодо безпеки. Це грамнегативна непатогенна пряма паличка завдовжки менше 1 мкм, одиночна або в парах, рухома за рахунок перитрихіальних джгутиків. Факультативний анаероб, володіє і дихальними, і бродильними типами метаболізму. Її місцем існування є кишечник людини, але вона також може висіватися з ґрунту і води. Оптимальна температура 37°C.

Для максимального накопичення біомаси штамом *Esherichiacoli* K12 обрано рідке поживне середовище Н15.

Для реалізації виробництва білку обрано технологічну схему, яка складається з стадій підготовки допоміжних робіт, основного технологічного процесу і стадії знешкодження відходів.

Підготовку поживного середовища проводять в реакторі шляхом змішування її компонентів. В реактор подаються всі солі, що входять до складу поживного середовища в необхідній кількості та вода деіонізована, змішування проводиться до повного розчинення солей при 120 об/хв мішалки. Охолодження проводиться водою при 28 °С, що подається в рубашку реактора.

Підготовка посівного матеріалу виконується в наступному порядку:

- Відновлення музейної культури
- Отримання культури I генерації
- Отримання культури II генерації

Культуру II генерації направляють до інокулятора.

В інокулятор вносять стерильне поживне середовище Н15 і додають посівний матеріал, закривають і культивують при температурі 32 °С 12 годин.

Після напрацювання інокулюму відбувається виробничий біосинтез у ферментері.

У стерильний ферментер вливають середовища H15 і культивують при температурі 32 °С протягом 20 год. Культуральну рідину постійно барботують повітрям.

Потім ТЕНи ферментера перемикають з температури 32 °С на режим 42 °С. У фазі теплового шоку (42 °С) культуру витримують 4 години.

Після біосинтезу відбувається збір біомаси. Розділення мікроорганізмів від культуральної рідини проводять центрифугуванням.

Наступними етапами є виділення та очищення рекомбінантного білку-антигену.

Це стадії: відмивання і зважування біомаси, лізис біомаси, обробка клітин лізоцимом, заморожування-розморожування суспензії, руйнування ДНК, обробка біомаси ультразвуком, відмивання тілець включення, яке відбувається циклічно на центрифугах і гомогенізаторах, в які вносяться розчини для відмивання. Очистку цільового білка проводять методом метал-хелатної хроматографії.

Розчин білків-антигенів розливають у пластикові флакони ємністю 10 мл/см<sup>3</sup> або 15 мл/см<sup>3</sup> з кришками.

Оскільки одним із завдань була розробка ділянки приготування поживного середовища, то було спроектовано реактор. Апарат обладнаний турбінною мішалкою для рівномірного та інтенсивного перемішування рідкого поживного середовища H15, рубашкою для забезпечення необхідного температурного режиму, а також приводом перемішуючого пристрою та валом перемішуючого пристрою.

Проект виконується з урахуванням вимог охорони праці, пожежної безпеки та екологічної безпеки. На основі аналізу шкідливих та небезпечних виробничих факторів нами передбачено заходи і засоби щодо створення на даному підприємстві безпечних умов праці і екології. Також передбачені заходи з безпеки в надзвичайних ситуаціях.

Висновки:

1. У дипломному проекті була розглянута і опрацьована технологія виробництва рекомбінантного білку HBcore вірусу гепатиту В з використанням продуценту *Esherichiacoli* K12.

2. Розглянуто систематичне положення, морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні особливості продуценту. Запропоновано методи створення високопродуктивного продуценту *Esherichiacoli* K12 та обрано технологію рекомбінантних ДНК.

3. Запропоновано та обґрунтовано технологічну схему для отримання рекомбінантного білку HBcore вірусу гепатиту В, яка складається з допоміжних робіт та стадій основного технологічного процесу. Обрані оптимальні параметри проведення приготування поживного середовища Н15.

4. Наведено характеристику кінцевої продукції та сировини, що використовується на виробництві. Представлена таблиця контрольних точок, де розглянуті об'єкти та методи контролю на виробництві.

5. Відповідно до технологічної схеми обрана і удосконалена апаратурна схема виробництва, яка дозволяє отримати продукт належної якості.

6. Розраховано апарат для приготування поживного середовища Н15. Були проведені технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки. Користуючись літературними даними було обране стандартне обладнання, а саме реактор об'ємом 25 л, обладнаний турбінною мішалкою і рубашкою для підтримки сталої температури в реакторі.

7. У проекті враховані вимоги до охорони праці, протипожежної безпеки та екологічної безпеки. На основі аналізу шкідливих небезпечних факторів передбачені засоби і заходи створення на спроектованому об'єкті безпечних умов праці і пожежної безпеки.