

**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 інсуліну.

Дільниця очистки цільового продукту

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

Якова Маргарита Юрївна  
(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 проф., д.т.н. Саблій Л.А.  
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

Інсулін - гормон білкової природи, що виробляється  $\beta$ -клітинами підшлункової залози для підтримки гомеостазу глюкози в крові. Нестача інсуліну в крові внаслідок придбаних або успадкованих факторів призводить до захворювання на цукровий діабет (ЦД). Це системне захворювання, неминуче веде до погіршення якості життя, а без лікування - до смерті. Щорічно помирає 5,5% хворих на діабет, рівень смертності серед них в 2-4 рази вище, а тривалість життя на 7-10 років менше, ніж серед осіб без порушень вуглеводного обміну. Більшість хворих на діабет потребують щоденного прийому препаратів інсуліну.

Відсутність сучасного, конкурентоспроможного вітчизняного виробництва інсуліну ставить нашу країну в залежність від зарубіжних виробників. В результаті виробництво препаратів на основі інсуліну стає актуальним питанням для нашої країни.

Мета - розробка технології отримання рекомбінантного інсуліну у стандартизованому вигляді для зменшення відсотка хворих на цукровий діабет в Україні.

Саме на основі цього проект мав наступні завдання:

- провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів;
- обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті;
- розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва;
- скласти матеріальний баланс виробництва, обрати технологічну і апаратурну схему;
- обґрунтувати вибір конструкції апарату, здійснити технологічний та конструктивний розрахунки.
- провести аналіз шкідливих та небезпечних факторів виробництва і навести методи їх попередження.

В якості продуценту для отримання цільового продукту у вигляді рекомбінантного інсуліну було обрано штам *E.coli* JM 109 з вбудованою рекомбінантною плазмідною рPINS 07, отриманої шляхом генетичного конструювання *in vitro*. Продуцент відноситься до 5 групи мікроорганізмів по Берджі – це грамнегативні факультативно анаеробні палички. Оптимальною температурою росту є 37°C. За типом харчування вони відносяться до хемоорганотрофів. У розділі також наведена хімічна структура інсуліну та схема хімічних перетворень для його отримання. Описано вплив цільового продукту на фізіолого-біохімічні процеси в організмі людини. Також один з розділів проекту присвячений загальним методам створення високопродуктивного промислового продуценту. Детально описана схема отримання високопродуктивного штаму.

Проектом передбачена робота над технологічною частиною. Наведена характеристика кінцевої продукції виробництва, характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві. Наведений докладний опис технологічного процесу, а також відповідно до нього складена технологічна схема, з урахуванням всіх необхідних допоміжних робіт та основних стадій технологічного процесу. Для реалізації технологічної схеми було обрано апаратну схему та підібрані ефективні та надійні матеріали для оптимальної роботи апаратів. Основне обладнання для дільниці очистки представлено хроматографічними колонами з насадками з ДЕАЕ-сефарози марки G-20 та G-10 та осаджувальними центрифугами на 20 та 25 тис об/хв.

У відповідності до технології було здійснено розрахунок обладнання для проведення високоякісної очистки рекомбінантного інсуліну, а саме іонообмінної колони закритого типу. Здійснено обґрунтування вибраної конструкції, наведена технічна характеристика колони та розрахунки, що підтверджують працездатність і надійність апарату. Розраховано та обране загальнозаводське обладнання для оптимальної роботи іонообмінної колони.

Проект виконано з дотриманням умов охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва. На основі аналізу шкідливих та небезпечних

виробничих факторів передбачено засоби та заходи щодо створення в цеху здорових і безпечних умов праці, пожежної безпеки.

Таким чином, були зроблені наступні висновки.

В дипломному проєкті було розроблено технологію виробництва інсуліну людського біосинтетичного за допомогою штаму–продуценту *Escherichia coli JM 109* з плазмідною *pPINS 07*.

1. Особливістю розробки технології одержання рекомбінантного інсуліну є використання якісної технології хроматографічної очистки інсуліну і його попередників на ДЕАЕ-сефарозі з використанням буферних розчинів з меншим вмістом сечовини та використання більш продуктивного штаму-продуцента для синтезу високоякісного людського інсуліну.

2. Були розглянуті морфолого-цитологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Escherichia coli*, що дозволили підібрати оптимальні умови для культивування даного продуценту в промисловій кількості.

3. На основі досліджених матеріалів було розроблено технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну, яка представлена на кресленні формату А1. На базі технологічної схеми виконано її апаратне оформлення, з вказанням необхідного технологічного обладнання, оптимальних параметрів роботи апаратури та допоміжних матеріалів, що використовуються в процесі отримання готового продукту.

4. Завдяки даним щодо продуценту та його особливостей було обрано конструкцію іонообмінної колони закритого типу для більш ефективної та якісної очистки за менший проміжок часу. Апарат дозволяє ефективно проводити процес у промисловому масштабі. Конструкція дозволяє стабілізувати необхідні для процесу параметри, такі як температура та консистенція розчину інсуліну; дозування елюенту для кращого очищення препарату. Зменшення часу проходження нативного розчину через іонообмінну смолу без погіршення ступеня очистки забезпечується використанням сучасного сорбента у вигляді ДЕАЕ-сефарози класу G-10.

Також є можливість проводити контроль параметрів на різних стадіях

очищення та за необхідності вдосконалювати апарат.

5. Були проведені технологічні розрахунки, які підтвердили доцільність використання обраної конструкції іонообмінної колони. Проектований апарат дозволяє ефективно проводити процес очистки людського цинк-інсуліну до ступеня очистки 98%.

6. Даний проект виконано з дотриманням умов охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва.