

**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 рекомбінантного інсуліну. Дільниця біосинтезу.

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

Алексеичук Леся Борисівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

_____ (підпис)

Керівник проф., д.б.н. Горчаков Володимир Юрійович
(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 ст.викл., к.т.н. Козар М.Ю.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Інсулін - гормон білкової природи, що регулює обмін вуглеводів та білків, підсилює транспорт амінокислот крізь мембрани та бере участь у реакціях обміну речовин. При відсутності або нестачі його синтезу розвивається таке захворювання як цукровий діабет. В більшості випадків єдиним засобом для підтримання життя і працездатності хворих на цукровий діабет є комплексний прийом антидіабетичних препаратів, діючою речовиною в яких виступає штучний гормон інсулін.

Тому задача розвитку і оптимізації біотехнологічних процесів, які забезпечують виробництво якісного та недорогого вітчизняного біосинтетичного інсуліну людини дуже актуальна сьогодні.

Метою даного дипломного проекту є вдосконалення технології отримання рекомбінантного інсуліну людини, яка гарантує збільшення виходу та покращення якості кінцевого продукту.

На основі цього проект мав наступні завдання:

- проаналізувати методи створення високопродуктивних промислових продуцентів;
- вибрати схему отримання продуценту,
- розглянути способи отримання кінцевого продукту;
- 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 шляхи їх попередження.

В даний час при виробництві препаратів рекомбінантних інсулінів економічно ефективною і найбільш поширеною з бактеріальних систем експресії є *E.coli*, до основних переваг якої належать низька вартість, простота умов культивування, швидкий ріст, відсутність ендотоксинів.

В якості продуценту для отримання цільового продукту у вигляді

рекомбінантного інсуліну було обрано штам *Escherichia coli* BL21/pPINS07. Для отримання великих кількостей чужорідних білків за допомогою рекомбінантних штамів *E.coli* була сконструйована плазміда pPINS07, що містить сильний промотор, селективний маркерний ген і коротку ділянку з декількома унікальними сайтами для рестриктаз– полілінкер, в яку власне вбудовують ДНК із людської хромосоми, яка відповідає за синтез проінсуліну – попередника інсуліну.

Один з розділів проекту присвячений загальним методам створення високопродуктивного промислового продуценту. Детально описана схема отримання високопродуктивного штаму. Продуцент відноситься до факультативних анаеробних грамнегативних бактерій царства Бактерії, типу Протеобактерії (*Proteobacteria*), класу Гама-протеобактерії (*Gamma Proteobacteria*), сімейства *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*.

Представники роду *Escherichia coli* мають капсулу поліпептидної природи. *E. coli* добре росте на звичайних поживних середовищах: мясопептонному бульйоні (МПБ) та мясопептонному агарі (МПА). Оптимальна температура росту 30-37°C.

Було досліджено ріст *E. coli* на різних поживних середовищах, описана схема отримання високопродуктивного штаму. Для накопичення інокуляту було обрано стандартне середовище LB, а в якості середовища для накопичення біомаси було обрано модифіковане агаризоване середовище, яке містить екстракт хлібопекарських дріжджів і солі - сульфат магнію; фосфат калію; хлорид натрію; ампіциліну натрія, що дозволяє отримати на 30% культури більше ніж при використанні стандартного середовища.

Наведена хімічна структура інсуліну та схема хімічних перетворень для його отримання. Описано вплив цільового продукту на фізіолого-біохімічні процеси в організмі людини.

Наведена характеристика кінцевої продукції виробництва, характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.

Докладно описані допоміжні роботи, стадії основного технологічного процесу, пакування, маркування готової продукції та переробки 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 робочих розчинів, піногасника, посуду та поживних середовищ).

Виробничий біосинтез відбувається у промисловому ферментері, об'ємом 50м³. У нього попередньо вносять поживне середовище та стерилізують парою. Після цього поживне середовища в ферментері перемішують, насичують киснем шляхом введення стерильного повітря через барботер та вносять інокулюм. Культивування проводять при температурі 37°C протягом 6 год, після чого культуральну рідину подають до теплообмінника і охолоджують.

Далі здійснюють відділення біомаси, очистку тілець включень, проводять рефолдинг третинної структури проінсуліну шляхом промивання в буфері. Наступний процес - ферментативна конверсія проінсуліну до активної форми – інсуліну. Решта стадій – очистка, концентрування та висушування інсуліну. Для реалізації технологічної схеми було вибрано апаратурну схему та підібрані ефективні та надійні матеріали для оптимальної роботи апарату.

В роботі складені технологічна та апаратурна схеми дільниці виробничого біосинтезу рекомбінантного інсуліну і представлені на кресленнях, виконаних за допомогою графічного редактора «Компас-V15».

У відповідності до технології було здійснено розрахунок обладнання для дільниці біосинтезу - ферментер з механічним перемішуючим пристроєм – турбінною мішалкою відкритого типу і барботером. Апарат має всі необхідні штуцери для проведення технологічного процесу, а також для підготовки апарату до роботи. Було здійснено обґрунтування вибраної

конструкції, наведена технічна характеристика ферментеру та розрахунки, що підтверджують працездатність і надійність апарату. Розраховано та вибране загальнозаводське обладнання для оптимальної роботи конструкції.

Були зроблені наступні висновки:

В дипломному проекті розглянуто технологію виробництва інсуліну методом глибинного культивування продуцента.

1. Було проаналізовано методи створення високопродуктивних штамів промислових продуцентів і для виробничого культивування обрано штам *Escherichia coli* BL21/pPINS07, для конструювання якого була використана рекомбінантна плазмідна ДНК pPINS07, що кодує гібридний поліпептид.
2. Для накопичення інокуляту було обрано стандартне середовище LB, а в якості середовища для накопичення біомаси було обрано модифіковане агаризоване середовище, яке містить екстракт хлібопекарських дріжджів і солі - сульфат магнію; фосфат калію; хлорид натрію; ампіциліну натрія, що дозволяє отримати на 30% культури більше ніж при використанні стандартного середовища.
3. Враховуючи особливості технології було розроблено технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну та апаратурну схему для дільниці біосинтезу.
4. Наведено перелік сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві, а також наведені параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу.
5. Для виробничого культивування було підібрано та розраховано ферментер з механічним перемішуючим пристроєм та барботером об'ємом 50м³, який забезпечує оптимальні умови росту бактеріальної культури. Проведені тепловий і гідравлічний розрахунки апарату підтвердили, що конструкція дозволяє підтримувати усі необхідні для

процесу параметри (температуру розчину, рН, інтенсивність перемішування, час культивування, температуру теплоносія в сорочці).

- б. Проект виконано з урахуванням вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки, проаналізовано шкідливі та небезпечні фактори виробництва та запропоновано методи їх запобігання в умовах виробництва.