

**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 людини.
Дільниця очистки цільового продукту.

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

Бердов Олександр Олександрович
(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник проф., д.б.н. Горчаков Валерій Юрійович
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

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

Рецензент старший викладач, к.т.н. Козар М.Ю.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2016 року

Інсулін - гормон білкової природи, що виробляється β -клітинами підшлункової залози для підтримки гомеостазу глюкози в крові. Нестача інсуліну в крові внаслідок придбаних або успадкованих факторів призводить до захворювання на цукровий діабет. Це системне захворювання, наслідком якого є високий вміст глюкози в крові, викликає ураження багатьох внутрішніх органів і систем організму, що неминуче веде до погіршення якості життя, а без лікування - до смерті. Цукровий діабет посідає третє місце за смертністю після серцево-судинних і онкологічних захворювань.

Інсулін виготовляють з підшлункової залози худоби (з можливою трансформацією), або біосинтетичним шляхом. Ефективнішим методом є біосинтетичний, тому що не потребує дорогої та дефіцитної сировини, використовуються високопродуктивні штамів рекомбінантні штами мікроорганізмів, що забезпечують стабільний рівень експресії вбудованого гена інсуліну людини, тому дипломний проект є актуальним.

Метою даного дипломного проекту є вдосконалення технології отримання рекомбінантного інсуліну зі штаму *Escherichia coli* JM109/pHI03, на основі якого виробляється препарат в формі розчину для ін'єкцій.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Обрати штам та підібрати оптимальний склад поживного середовища для біосинтезу цільового продукту.
2. Розглянути основні морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості продуценту.
3. Проаналізувати основні методи отримання промислового продуценту та запропонувати схему отримання продуценту на основі опрацьованих матеріалів.
4. На основі даних фахової літератури запропонувати технологічну та апаратурну схему виробництва рекомбінантного інсуліну та скласти матеріальний баланс для стадії очистки цільового продукту.

5. Обґрунтувати вибір конструкції для здійснення процесу ферментолізу, підібрати загальнозаводське обладнання та зробити розрахунок реактора для проведення ферментативного гідролізу гібридного білку.

В якості продуценту для отримання цільового продукту у вигляді рекомбінантного інсуліну було обрано штам *E.coli* JM 109 з вбудованою рекомбінантною плазмідною рНІ03, отриманої шляхом генетичного конструювання *in vitro*. Клітини *E.coli* – це грамнегативні палички з заокругленими кінцями, рухливі, факультативні анаероби. Оптимальною температурою росту є 37°C. За типом харчування відносяться до хемоорганотрофів. Спори не утворюють.

Розглянуто загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту, а також детально описана схема отримання висопродуктивного штаму.

Наведена характеристика кінцевої продукції виробництва, характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві. Технологічна схема виробництва представлена на аркуші формату А1. Технологічна схема містить етапи допоміжних робіт та стадії основного технологічного процесу, стадії пакування, маркування, відвантаження, переробки та знешкодження відходів. аркуші формату А1.

Допоміжні роботи представлені: санітарна підготовка виробництва, підготовка вентиляційного та технологічного повітря, підготовка піногаснику, підготовка води для ін'єкцій, підготовка ампул, приготування живильних середовищ для стадій отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу та підготовка посівного матеріалу.

Стадії основного технологічного процесу: виробничий біосинтез, відділення біомаси, руйнування клітин та виділення тілець включення центрифугуванням, рефолдінг проінсуліну, іонобмінна очистка, ферментативний гідроліз гібридного білку, гель-хроматографічна очистка,

осадження інсуліну ацетатом цинку, центрифугування та гель-хромаграфічна чистка осаду.

У відповідності до стадій технологічного процесу та показників, які необхідно контролювати, наведено перелік контрольних точок для кожного етапу, вказані норми та методи виміру. Охарактеризовано сировину, матеріали та напівпродукти кожної стадії, розрахований матеріальний баланс дільниці очистки цільового продукту.

Оскільки основним завданням дипломного проекту була розробка дільниці очистки цільового продукту, було розроблено реактор-змішувач для підготовки розчину гібридного білку до ферментативного гідролізу. Апарат зображено на аркуші формату А1.

Апарат оснащений кожухом, в який подається холодна вода, та пропелерною мішалкою, яка була вибрана через малий об'єм апарату та велику інтенсивність енергообміну, яку вона забезпечує. Об'єм апарату становить $0,25 \text{ м}^3$, коефіцієнт заповнення – 0,6.

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

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.

1. У дипломному проекті було розглянуто продуцент *Escherichia coli*, що дає змогу отримувати рекомбінантний інсулін людини.
2. Розглянуто особливості виробництва даного лікарського засобу, характеристику його компонентного складу, а також, методи очистки рекомбінантних інсуліну людини.
3. Запропоновано використовувати штам-продуцент *Escherichia coli JM109/pHI03* з гібридними ДНК, що отримано рестриктазно-лігазним методом за рахунок рекомбінатної плазміди *pHI03*.

4. Встановлено найбільш сприятливі умови для культивування штаму-продуценту *Escherichia coli* рекомбінантних інсуліну: температура 37°C, аерація, постійне перемішування 120 об/хв.
5. Розраховано та запропоновано конструкцію апарату для проведення процесу охолодження розчину гібридного білку перед ферментативним гідролізом. Було обрано реактор-змішувач з сорочкою, об'ємом 0,25 м³, пропелерною мішалкою та частотою обертання мішалки -2,67 с⁻¹. Технологічні, конструктивні розрахунки та технічна характеристика апарату, наведені в даній роботі, підтверджують правильність вибору технологічного обладнання.