

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 білка MOMP *Chlamydia trachomatis*. Дільниця підготовка посівного матеріалу

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

\_\_\_\_\_ Полозюк Юлія Володимирівна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник \_\_\_\_\_ ст. вик. Ліновицка В.М. \_\_\_\_\_  
(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 \_\_\_\_\_ доц., к.т.н. Шурська К.О. \_\_\_\_\_  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Київ – 2016 року

*Chlamydia trachomatis* – облігатний внутрішньоклітинний паразит, що є причиною широкого спектру людських захворювань, серед яких найбільш поширеними є трахома, лімфогранульома та уrogenітальні хламідіози, що передаються статевим шляхом і є особливо небезпечними для репродуктивної системи організму. Отже, питання швидкої діагностики цих захворювання гостро постають як в Україні, такі і в світі.

Для виробництва імуноферментних діагностичних тест-систем є необхідними поверхневі білки МOMP хламідій з антигенними властивостями. Отримання нативного білка з клітин хламідій – це досить складний та дорогий процес, і тому на сьогодні використовуються рекомбінантні білки – аналоги антигену збудника хвороби.

Метою даного дипломного проекту є удосконалення технології виробництва рекомбінантного білка МOMP *C.trachomatis* для виробництва імуноферментних тест-систем та наукових досліджень.

Новизна даного проекту полягає в тому, що було розроблено лінію виробництва рекомбінантного білка МOMP *C.trachomatis* з удосконаленим процесом підготовки посівного матеріалу.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання: вивчити систематичне положення, морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні особливості продуценту; дослідити біохімічні основи виробництва, а саме: дати характеристику кінцевому продукту, описати схему хімічних перетворень та навести характеристику компонентного складу біотехнологічного препарату, також описати методи очистки цільового продукту та механізми впливу його на біохімічні процеси; відповідно до генетичної вивченості об'єкту, навести схему отримання продуценту; скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва та підібрати відповідне обладнання; розрахувати апарат, який би задовольняв усі умовам підготовки посівного матеріалу, виконати його креслення, передбачити всі необхідні вимоги щодо охорони праці та охорони навколишнього середовища на виробництві рекомбінантного білка МOMP .

В якості продуцента цільового бактерійного рекомбінантного білка МОР *Chlamydia trachomatis* виступають анаеробні грамнегативні мікроорганізми виду *Escherichia coli*. *E.coli* – факультативний анаероб, проте для оптимальної продукції рекомбінантних білків культуру вирощують в аеробних умовах.

*Escherichia coli* - класичний об'єкт молекулярної генетики, що здатний продукувати рекомбінантні бактеріальні білки у великих кількостях та є найбільш вивченим об'єктом в генній інженерії.

Цільовий білок отримують за допомогою рекомбінантного штаму *E.coli*, модифікованого плазмідною трансформацією. Для запуску механізму біосинтезу рекомбінантного білка МОР необхідно індукувати експресію клонованих генів термічним шляхом при температурі 42 °С.

Виробничим процесам передують ряд допоміжних робіт, які включають в себе підготовку деіонізованої води, технологічного повітря, стерилізацію обладнання, санітарну підготовку працівників, приготування поживних середовищ для відтворення музейної культури, підготовку посівного матеріалу, виробничого культивування та розчинів.

Після санітарної підготовки виробництва, посуду, стерильного повітря та живильних середовищ, починається основний процес підготовки посівного матеріалу. Він складається з кількох етапів:

- відновлення музейної культури,
- отримання первинної матричної культури,
- отримання вторинної матричної культури,
- і, нарешті, власне виробничий біосинтез.

Підготовка посівного матеріалу здійснюється на середовище LB, яке містить всі необхідні компоненти для швидкого росту продуцента. Виробниче культивування проводять на середовище H15.

По закінченню виробничого культивування відділення клітин від культуральної рідини здійснюється методом центрифугування з подальшим використанням осаду, представленого клітинами продуценту. З від

центрифугованої біомаси шляхом хімічного, фізичного та біологічного лізису, після тривалої стадії відмивання тілець включень, отримують розчин білку готового для очищення. Такий білок пропускають через хроматографічну колонку з використанням NTA-сефарози. Ступінь очистки білка контролюють на електрофорезі в на поліакриламідному гелі, порівнюючи його з референс-білком. Очищений білок розчиняють буферним розчином до необхідної концентрації та передають на стадію пакування, маркування, відвантаження. Готовий продукт фасують в стерильні флакони.

Всі стадії виробничого процесу проходять технологічний та мікробіологічний контроль. В роботі охарактеризовано методи контролю для кожної стадії.

В дипломному проекті було наведено характеристику сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.

Також був розрахований матеріальний баланс стадії підготовки посівного матеріалу.

Оскільки завданням даного проекту була розробка ділянки підготовки посівного матеріалу, було підібрано і спроектовано інакулятор для виробничого культивування мікробної маси обраного штаму-продуценту.

Для створення оптимальних умов росту бактеріальної культури *Escherichia coli* до інакулятора висувається ряд вимог:

- забезпечення термостатування мікробної суспензії в кожній точці середовища;
- забезпечення підтримання оптимальних робочих параметрів в кожній точці робочого об'єму;
- забезпечити необхідний рівень аерації, перемішування;
- забезпечити високий рівень автоматизації процесу культивування, техніки безпеки та охорони праці персоналу.

Обраний інакулятор об'ємом 25 л задовольняє поставленим умовам. Апарат оснащений барботером для постійного підводу повітря, установкою для термометра, заміром тиску, датчиком рН-метра, провідбірниками.

Здійснений розрахунок підтвердив надійність обраної конструкції та забезпечення відповідного контролю параметрів. Оскільки метою роботи було удосконалення виробництва білку, а саме ділянки підготовки посівного матеріалу, також було підібрано апаратурну та технологічну схеми лінії виробництва рекомбінантного білка МОР *S.trachomatis*, що враховують особливості технології даного виробництва та включають усі стадії допоміжних робіт та технологічного процесу, параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу.

Оскільки на виробництві використовується електрична, механічна, теплова енергія; в обігу знаходяться шкідливі, пожежо-, вибухонебезпечні, токсичні та горючі речовини і матеріали, було враховано охорону праці та навколишнього середовища. Таким чином проект виконано за вимогами охорони праці, пожежної безпеки та екології.

Висновки:

1. В дипломному проекті розглянута технологія виробництва рекомбінантного білка МОР *S.trachomatis* за допомогою продуценту штаму *Escherichia coli*.
2. Наведено характеристику кінцевого продукту, сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються в даному виробництві.
3. Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва рекомбінантного білка МОР *S.trachomatis* з урахуванням особливостей культивування обраного продуцента *E. coli*.
4. Розраховано матеріальний баланс стадії підготовки посівного матеріалу рекомбінантного білка МОР *S.trachomatis*.
5. З урахуванням потреб культури штаму *Escherichia coli* та особливостей температурного режиму обрано конструкцію інакулятора об'ємом  $0,025 \text{ м}^3$  для проведення підготовки посівного матеріалу. Наведено конструктивний та тепловий розрахунки, що підтверджують придатність обраного обладнання для даного виробництва.

6. Розглянуто вимоги до охорони праці та навколишнього середовища, проведено аналіз шкідливих та небезпечних факторів, запропоновано шляхи їх усунення.