

Здравствуйте, уважаемые члены аттестационной комиссии!

Тема моей выпускной квалификационной работы - «Технологические особенности препарата трипсин на предприятии ООО Самсон-Мед.».

Актуальность темы обусловлена тем, что производство ферментных препаратов, получаемых из органов животных, является одним из лидирующих направлений современной биотехнологии и относится к отраслям, объем продукции, которых постоянно растет, а сфера применения расширяется.

Целью работы является изучение технологических стадий производства протеолитического препарата Трипсин на основании технологического регламента на комплексное производство ферментных препаратов.

Объектом исследований стала поджелудочная железа крупного рогатого скота.

Предметом – фермент трипсин.

Поджелудочная железа крупного рогатого скота (Pancreas)– орган с двойной секрецией - внешней и внутренней. Внешнесекреторная часть поджелудочной железы вырабатывает панкреатический (поджелудочный) сок, принимающий участие в расщеплении белков, жиров и углеводов корма; внутрисекреторная часть железы продуцирует гормоны инсулин и глюкагон, регулирующие углеводный обмен, и гормон липокаин, принимающий участие в регуляции жирового обмена.

Известно, что поджелудочная железа крупного рогатого скота содержит целый ряд ферментов различной субстратной спецификации, в частности трипсин КФ (3.4.21.4), химотрипсин (3.1.1.3), карбоксиполипептидазы(КФ 3.4.16.1), рибонуклеазы.

Трипсин расщепляет белки до аминокислот и выделяется в виде неактивного трипсиногена, который активируется ферментом кишечного сока энтерокиназой.

Химотрипсин расщепляет белки и полипептиды до аминокислот и выделяется в форме неактивного химотрипсиногена; активируется трипсином. Карбоксипептидаза действует на полипептиды, отщепляя от них аминокислоты. Рибонуклеаза – деполимеризует РНК до кислотно-растворимых моно - и олигопептидов.

Сырьем для производства ферментных препаратов служит ферментное сырье – поджелудочная железа (орган двойной секреции) крупного рогатого скота. Поджелудочную железу собирают только от здоровых животных после ветеринарного освидетельствования их перед убоем и ветеринарной экспертизы.

Важнейшее условие правильной организации сбора ферментного сырья - быстрое извлечение его из туши животного. Время с момента извлечения поджелудочной железы до замораживания не должно превышать 1,5 часа, иначе активность сырья резко снижается.

Для изготовления трипсина в качестве сырья берут поджелудочную железу крупного рогатого скота.

Сперва проводится отбор и подготовка проб. Для проведения испытаний при замораживании поджелудочных желез поштучно берут не менее чем по 5 желез из каждого ящика.

Следующий этап - определение внешнего вида и цвета. Внешний вид и цвет, замороженных поджелудочных желез определяют визуально при дневном свете.

В общем виде технология получения кристаллического трипсина на основе эндокринно-ферментного сырья животного происхождения основана на следующих операциях:

- Приготовление экстракционной смеси. Для проведения экстракции используют 0,25н раствор серной кислоты.
- Измельчение поджелудочной железы, первая экстракция. 300 кг замороженной поджелудочной железы крупного рогатого скота, измельчают на измельчителе специальной конструкции.
- Вторая экстракция и разделительная фильтрация. Вторую экстракцию проводят 0,25н раствором серной кислоты в соотношении 1:1.
- Высаливание и отделение балластных белков. Высаливание балластных веществ, проводят кристаллическим сернокислым аммонием до степени насыщения 0,19.
- Выделение ДНК-азы высаливанием. Отстаивание и фильтрация. Высаливание ДНК-азы из фильтрата проводят кристаллическим сернокислым аммонием.
- Высаливание химотрипсиногена и трипсина из фильтрата.
- Растворение осадка и удаление балластных веществ.
- Высаливание химотрипсина и трипсина.
- Кристаллизация химотрипсиногена и отделение его от трипсина.
- Фильтрат с промывными водами после отделения химотрипсиногена переносят в холодную камеру и передают для получения кристаллического трипсина.
- Все операции по очистке и кристаллизации трипсина проводят при температуре не выше +5°C.
- Высаливание аморфного трипсина и очистка от балластных веществ.
- Осаждение аморфного трипсина.
- Смена ионов и кристаллизация трипсина.
- Перекристаллизация трипсина.
- Диализ.
- Обессоливание.
- Стерильная фильтрация.
- Стерильный розлив. За 2-3 часа до начала стерильного розлива препарата включают бактерицидные лампы. Непосредственно перед розливом, в бок вносят кассету, с розливочным шприцем, бутылки со стерильным раствором и другие вспомогательные материалы. Стерильный розлив во флаконы можно вести параллельно с процессом стерильной фильтрации. Розлив осуществляют на разливочной машине с помощью разливочного шприца.

- Замораживание и сублимационная сушка. Проморозку ведут в морозильной камере или в сублиматоре. Раствор, оставшийся от стерильной фильтрации и розлива, промораживают в морозильном столе.
- Сублимационная сушка ферментов во флаконах. Сушка ферментов происходит на сублимационной установке
- Упаковка готовой продукции.

Выводы

1. Поджелудочная железа крупного рогатого скота содержит сложный набор гидролитических ферментов действующих на различные классы веществ – белки, жиры, нуклеиновые кислоты, углеводы. Некоторые ферменты (нуклеазы и амилазы) секретируются в поджелудочный сок сразу в активном состоянии, а другие ферменты - протеазы, фосфолипаза синтезируются тканью железы в виде неактивных предшественников-зимогенов и превращаются в активные ферменты уже в самом поджелудочном соке.

Известно, что поджелудочная железа КРС содержит целый ряд ферментов различной субстратной спецификации, в частности трипсин КФ (3.4.21.4), химотрипсин (3.1.1.3), карбоксиполипептидазы (КФ 3.4.16.1), рибонуклеазы.

2. Трипсин содержится в поджелудочной железе в виде предшественника фермента — зимогена, называемого трипсиногеном. Молекулярная масса трипсиногена 23,0-23,8 кДа. Трипсины различного происхождения имеют близкий качественный и количественный набор аминокислот и форму кристаллов. Молекулы трипсина и трипсиногена имеют глобулярное строение. Бычий трипсин представляет собой белки с сильно выраженными основными свойствами, ИЭТ около рН 10,5, оптимум каталитической активности наблюдается в интервале рН 7,0-9,0, при температуре около 50°C. Трипсин состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, содержащую шесть дисульфидных связей. Последовательность аминокислотных остатков фермента полностью расшифрована.

3. Важным условием правильной организации сбора ферментного сырья является быстрое извлечение его из туши животного, что влияет на активность фермента. С момента извлечения поджелудочной железы до замораживания время не должно превышать 1,5 часа. Для сохранения биологических свойств ферментное сырье после сбора и очистки консервируют.

4. В результате экспериментального анализа определения протеолитической активности готового трипсина, было установлено, что активность фермента в образцах составила 1,527 ПЕ и 1,447 ПЕ в 1 мг, что является удовлетворительными требованиям ФСП на данный препарат (1,2 ПЕ).

На сегодняшний день компания ООО «Самсон-Мед» российское фармацевтическое предприятие полного производственного цикла.

В настоящее время на предприятии ООО «Самсон - Мед» внедрена и успешно применяется эффективная сорбционная технология с использованием ионообменных процессов на стадиях разделения и очистки ферментов.

ООО «Самсон - Мед» является производственной базой для разработки опытных образцов и экспериментальных серий новых лекарственных препаратов,

разрабатываемых учеными. На базе НПЛ ООО «Самсон – Мед» ведутся разработки современных технологий получения большого ассортимента биологически активных веществ из сырья животного происхождения.

Производство подобной продукции – дело ближайшего будущего.

Таким образом, Цель работы - изучение технологических стадий производства протеолитического препарата Трипсин на основании технологического регламента на комплексное производство ферментных препаратов–**достигнута.**

Спасибо за внимание! Доклад окончен.