

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » червня 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » червня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Культивування *Clostridium tetani* для одержання вакцини протиправцевої.

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2
СОКОЛОВА Олександр Андріївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ПЕНЧУК Юрій Миколайович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СОКОЛОВОЇ Олександр Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Clostridium tetani* для одержання вакцини протиправцевої

керівник роботи ПЕНЧУК Юрій Миколайович, к.т.н., доцент

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затвержені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи *Clostridium tetani*, цільовий продукт: Правцевий анатоксин, об'єм ферментера 10 л, коефіцієнт заповнення 0.8.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ

1. Характеристика цільового продукту, РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне

обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту, РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми, РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання,

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми, РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва, РОЗДІЛ 9 Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1, Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 04.03.24	Виконано
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.03.24 - 13.03.24	Виконано
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.03.24 - 20.03.24	Виконано
4	Біосинтез цільового продукту	21.03.24 - 24.03.24	Виконано
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	25.03.24 - 30.03.24	Виконано
6	Специфікація обладнання	31.03.24 - 06.04.24	Виконано
7	Опис технологічної схеми	07.04.24 - 13.04.24	Виконано
8	Контроль виробництва	14.04.24 - 24.04.24	Виконано
9	Охорона довкілля	25.04.24 - 09.05.24	Виконано
10	Оформлення пояснювальної записки	10.05.24 - 19.05.24	Виконано
11	Виконання графічної частини роботи	20.05.24 - 28.05.24	Виконано

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олександра СОКОЛОВА

_____ (ім'я та прізвище)

Юрій ПЕНЧУК

_____ (ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	7
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукт.....	13
1.1 Органолептичні показники та молекулярна структура.....	13
1.2 Синтез тетаноспазмину та сфери застосування.....	14
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	16
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	16
2.2. Обробка даних	25
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	26
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	28
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	30
3.1. Потреба в цільовому продукті – правцевому анатоксину	30
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	33
3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера.....	35
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	37
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	40
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	40
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	41

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	44
5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	44
.....	47
5.2. Обґрунтування стадій підготовки азоту	47
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	50
5.3.1 Характеристика миючих засобів	50
5.3.2 Характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів.....	52
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	54
5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	56
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	66
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	67
ДР 1. Приготування розчинів для титрування	67
ДР 2. Приготування і стерилізація поживних середовищ.....	69
ДР. 3 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л :.....	70
ТП 4. Підготовка посівного матеріалу.....	72
ТП . 5 Біосинтез	73
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	74
8.1. Мікробіологічний контроль	74
8.2 Контроль показників росту та синтезу	76
8.2.1 Визначення біомаси <i>Clostridium tetani</i>	76
8.2.2 Визначення концентрації тетаноспазмину	77
8.2.3 Визначення вмісту амінного азоту йодометричним методом.....	79

(мідним методом)	79
8.2.4 Визначення вмісту вуглеводів методом Шорля.....	80
8.4. Показники якості готового продукту	81
РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва..	81
9.1 Системи знешкодження рідких відходів	85
9. 1. 1 Визначаємо середні витрати стічних вод від виробничого підприємства	86
9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів	89
9.3. Системи знешкодження твердих відходів	90
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	92

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу *Clostridium tetani Massachusetts's* який під час культивування у середовищі 43 Lf/мл тетаноспазмину. Характеристиці цільового пробдукту та самого біологічного агента, ознайомленню з його структурою, властивостями та небезпекою. Техніко-економічному обґрунтуванню, розкриттю нюансів контролю виробництва. Тетаноспазмін після інактивації використовується як компонент комплексної АКДП вакцини (адсорбовану коклюшно-дифтерійно-правцеву вакцину).

Обґрунтування вибору штамів *Clostridium tetani* та поживного середовища для їх культивування. Також визначення умов і способу культивування біологічного агента та підготовки поживного середовища.

Схема виробництва анатоксину включає допоміжні роботи, такі як: підготовка суміші азоту, приготування розчинів для титрування, приготування та стерилізація поживних середовищ, підготовка посівного матеріалу. Та самого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 л із коефіцієнтом заповнення 0.8. Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу.

Кваліфікаційний проект викладений на 97 сторінках, містить 12 таблиць, 9 рисунків,

складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (52 найменувань), 2 додатків, технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 21 аркуші) схем.

Ключові слова: *Clostridium tetani*, правець, вакцина, тетаноспазмін (тетанотоксин, TeNT), антитоксин, біосинтез, культивування, екзотоксини.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and hardware schemes for the biosynthesis of *Clostridium tetani* Massachusetts's tetanospasmin during cultivation in 43 Lf/ml tetanospasmin medium. Characterization of the target product and the biological agent itself, familiarization with its structure, properties and hazards. Feasibility study, disclosure of the nuances of production control. After inactivation, tetanospasmin is used as a component of a complex DPT vaccine (adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccine).

Justification of the choice of *Clostridium tetani* strains and culture medium for their cultivation. Also, determination of the conditions and method of cultivation of the biological agent and preparation of the culture medium.

The anatoxin production scheme includes auxiliary activities, such as preparation of nitrogen mixture, preparation of titration solutions, preparation and sterilization of culture media, and preparation of inoculum. The same biosynthesis is carried out in a 10-liter fermenter with a filling factor of 0.8. A map of stage-by-stage control of pre-fermentation processes and production biosynthesis was developed.

The diploma project is set out on 97 pages, contains 12 tables, 9 figures,

It consists of an introduction, nine chapters, a list of references (52 titles), 2 appendices, technological (A1 format, 1 sheet) and hardware (A1 format, 21 sheets) diagrams.

Key words: *Clostridium tetani*, tetanus, vaccine, tetanospasmin (tetanotoxin, TeNT), antitoxin, biosynthesis, cultivation, exotoxins.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

TeNT – тетаноспазмін, тетанусний токсин.

ДР - допоміжні роботи.

ТП - технологічний процес.

АКДП - адсорбована коклюшно-дифтерійно-правцева вакцина

АДП-М – адсорбований дифтерійно-правцевий анатоксин зі зменшеним вмістом антигенів.

ОЗ – одиниці зв'язування

ВСТУП

Clostridium tetani є етіологічним збудником правця, небезпечної для життя бактеріальної інфекції. Вона виробляє тетаноспазмін (TeNT), що володіє нейротоксичними властивостями і тетанолізін, що володіє гемолітичними властивостями [1].

Для боротьби з цим небезпечним патогеном була розроблена протиправцева вакцина, в основі якої лежить біосинтез анатоксину - безпечної та ефективної форми токсину, здатної стимулювати імунну відповідь організму.

Правець досить широко поширений у багатьох країнах світу, є невирішеною проблемою сучасної охорони здоров'я, біології та медицини. Неослабна увага пояснюється багатьма причинами, серед яких головна - дуже висока летальність[4].

Незважаючи на давність хвороби та прогрес досягнутий за останні роки, летальність досягає 40% навіть у найкращих, спеціалізованих лікарнях світу. У світі зареєстровано близько 300 000 випадків на рік. А у країнах, що розвиваються, ця хвороба залишається однією з 10 основних причин смертності населення [1].

Правець є унікальним серед захворювань, яким можна запобігти за допомогою вакцинації, оскільки він не є заразним і імунітет досягається лише шляхом вакцинації. Спори *Clostridium tetani* , широко поширені в навколишньому середовищі, тому правець неможливо викоринити. Коли спори *C. tetani* вводяться в анаеробні умови, які знаходяться в девіталізованих тканинах або проколах, вони проростають до вегетативних бацил, які виробляють токсин. Клінічна картина є результатом дії цього токсину на центральну нервову систему. Профілактика правця зараз майже повсюдно можлива шляхом використання високоімуногенних і безпечних вакцин, що містять правцевий анатоксин [3].

Для профілактики, мільярди людей і незліченна кількість тварин імунізовані високоефективною вакциною, промислово виготовленою шляхом широкомасштабної ферментації. Однак виробленню токсинів часто перешкоджають низькі врожаї та мінливість від партії до партії. Підвищення продуктивності було обмежено відсутністю розуміння молекулярних механізмів, що контролюють виробництво токсинів [2].

Актуальність дослідження цієї теми зумовлена не лише важливістю боротьби з інфекцією але й постійною необхідністю вдосконалення технологій виробництва вакцин з більшим розумінням механізмів біосинтезу токсину. Оскільки правець можна легко контролювати за допомогою імунізації вакцинами проти правця, виготовленими з очищеного правцевого анатоксину, тому існує великий попит на очищений правцевий анатоксин хорошої якості та високої антигенної цінності [47].

Тема вакцини протиправцевої є вкрай важливою в контексті глобального здоров'я та профілактики інфекційних захворювань. Вакцина протиправцева визначається своєю унікальністю в тому, що вона спрямована на захист від токсину, який виділяється бактерією, а не самої бактерії. Ця новизна в підході дозволяє створити ефективний метод профілактики тетанусу, що допомагає зменшити ризик зараження і подальших ускладнень. Важливою частиною імунізаційних програм по всьому світу, ця вакцина є прикладом вдосконалення сучасної медицини в боротьбі з інфекційними захворюваннями та збереження здоров'я населення.

Біосинтез анатоксину є складним процесом, що вимагає високої точності та ефективності. Тому, новизна досліджень у виробництві протиправцевої вакцини зосереджена на вирішенні проблем, пов'язаних зі складністю біосинтезу анатоксину, а також на спрощенні та здешевленні виробничих процесів. Це

дозволяє створювати вакцини високої якості за доступною ціною, що є важливим для глобальної профілактики правця та покращення громадського здоров'я.

Однак, виробництво вакцини стикається з численними викликами, зокрема низьким виходом токсинів та значною варіативністю між виробничими партіями. Це обмежує продуктивність та стабільність вакцини.

У цьому контексті, дослідження з технічних аспектів біосинтезу анатоксину мають велике значення, сприяючи створенню більш досконалих та ефективних методів виробництва вакцин проти правця, що у свою чергу сприяє громадському здоров'ю та запобіганню спалахам даного захворювання [7].

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Clostridium tetani виробляє тетаноспазмін (TeNT) , що володіє нейротоксичними властивостями і тетанолізін, що володіє гемолітичними властивостями [1].

Clostridium tetani є етіологічним збудником правця, небезпечної для життя бактеріальної інфекції. Найефективнішою стратегією захисту від правця є вакцинація нейротоксином *C. tetani* , який інактивується формальдегідним зшиванням [2].

Тетаноспазмін діє на периферичну нервову систему і викликає тонічні скорочення поперечносмугастої мускулатури. Його смертельна доза складає 2,5 нанограм на кг маси тіла людини [1].

1.1 Органолептичні показники та молекулярна структура

Правцевий токсин - це один пептид масою приблизно 150 кДа, який складається з 1315 амінокислотних залишків. Токсин утворює дволанцюгову активовану молекулу, що складається з важкого ланцюга (НС) і легкого ланцюга (LC), з'єднаних дисульфідним зв'язком (рис.1.1).

					НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ					
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ					
Розроб.	Соколова О.А.									
Перевір.	Пенчук Ю.М.									
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.				Літ.		Арк.		Аркушіє	
							13		99	
					Кафедра БТМ			13		

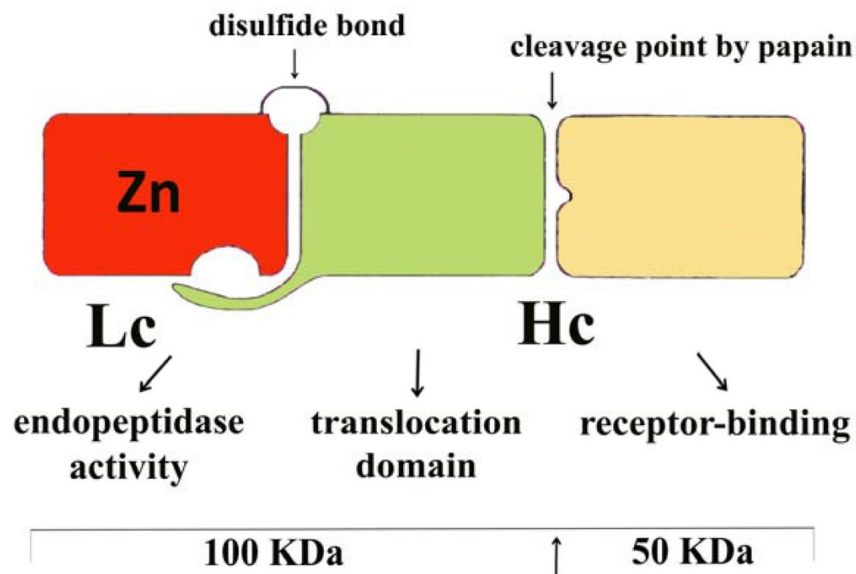


Рис.1.1. Діаграма молекули правцевого токсину [3].

Правцевий і ботулінічний токсини є металопротеазами цинку, які розщеплюють білки SNARE (розчинний рецептор приєднання NSF), які перешкоджають злиттю синаптичних везикул з плазматичною мембраною і, зрештою, блокують вивільнення нейромедіаторів у нервових клітинах [3].

Загалом TeNT - це біологічний токсин, і його властивості визначаються його впливом на живу тканину і систему організму, а не фізичними або хімічними характеристиками, що є характерними для хімічних речовин [4].

1.2 Синтез тетаноспазмину та сфери застосування

TeNT виробляється з культур *C. tetani*, вирощених в умовах класичної періодичної ферментації. Наприкінці ферментації, через ~150 годин, активний токсин збирають із супернатанту культури. Потім токсин інактивується

формаліном перед змішуванням з іншими компонентами для використання в полівалентних вакцинах. Середовище, що використовується для виробництва TeNT, має вирішальне значення і зазвичай складається з пептидів із розщепленого казеїну, сої або іноді інших пептонів рослинного походження, які за своєю суттю мають непостійну якість [5].

Тетанусний токсин (TeNT) - це надзвичайно небезпечний біологічний токсин, однак TeNT також може бути використаний у медичних дослідженнях та лабораторних дослідженнях для вивчення нейрологічних процесів та механізмів нейротоксичності та створення вакцин:

- TeNT може використовуватися для дослідження нейронів і їхньої активності в лабораторних умовах. А саме може бути використаний для вивчення механізмів, які призводять до м'язових спазмів і інших неврологічних симптомів тетанусу.
- Також TeNT може використовуватися при розробці протимікробних препаратів. Деякі дослідники досліджують можливість використання TeNT для розробки протимікробних препаратів, оскільки токсин має здатність уражати інші мікроорганізми, крім людини.
- В якості вакцини проти тетанусу використовується анатоксин (неактивний токсин) тетанусу, іноді його називають токсодом тетаноспазміну. Анатоксин тетанусу - це токсин, який був знесхожений або неактивований таким чином, щоб він не міг спричинити захворювання, але залишив свої антигенні властивості, які стимулюють імунну систему виробляти антитіла проти тетанусного токсину.

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Збудника правця вперше виявили та описали незалежно один від одного Н.Д.Монастирський і А.Ніколайер. У 1890 році отримано токсин правцевої палички Е.Берінгом і С.Кітазото [6].

Ген, що кодує тетаноспазмін, знайдений на плазміді, що переноситься багатьма штамми *C. tetani*; штами бактерій без плазміди не здатні виробляти токсин.

Clostridium tetani класифікується в межах роду *Clostridium*, широкої групи з понад 150 видів грампозитивних бактерій. *C. tetani* входить до групи з майже 100 видів, які більш тісно пов'язані один з одним, ніж з будь-яким іншим родом. Цей кластер включає інші патогенні види *Clostridium*, такі як *C. botulinum* і *C. perfringens*. Найближчим родичем *C. tetani* є *C. cochlearium* [1].

Клостридії є різноманітними родами анаеробних організмів, що складаються з щонайменше 209 видів і п'яти підвидів. *Clostridium tetani* є одним із чотирьох найвідоміших патогенів, що продукують екзотоксини, у цій категорії та єдиним збудником захворювання, відомого як правець [10].

В даній технології для виробництва анатоксину було вибрано штам *Clostridium tetani Massachusetts's*. Також для виробництва використовують штами, та Гарвардський штам *Clostridium tetani №. 49205 (C. tetani Harvard №. 49205)*

Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ			
Розроб.		Соколова О.А.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					16	99
Реценз.						Кафедра БТМ 16		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Обраний штами має високу імуногенну активність, володіє стабільними морфологічними та кінтурально-біохімічними властивостями. Для виробництва правцевого анатоксину запропоновано цілий ряд поживних середовищ: напівсинтетичне казеїнове середовище, казеїноворослинне, казеїново-рибне, м'ясо-казеїнове і поживні середовища з м'яса, Летема-Мюллера (Latham Mueller (LM)).

Існує залежність між кількістю правцевого токсину і хімічним складом використовуваного середовища. Встановлено, що токсини, більш високої сили та концентрації, можна отримати на середовищах, що містять великі кількості малорозщеплених білків і мають низький амінопептидний коефіцієнт, та містять глутамат натрія. В якості середовища для накопичення правцевого токсину у ферментері було обрано середовище Летема-Мюллера та середовище зі шматочків бикової печінки [1].

Особливості одержання поверхнево-активних речовин на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість Культивування, год	Концентрація цільового продукту, Lf/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	Концентрація, г/л				
<i>Clostridium tetani</i> <i>Massachusetts's</i>	Середовище №1: Летема-Мюллера		82	43	34 °C pH 6,8-7,4. Ферментер об'ємом 1 м ³ . Апарат оснащений установкою для термометра, заміром тиску, датчиком рН-метра. В ферментер подається азот для забезпечення анаеробних умов в процесі біосинтезу	I. Gutiérrez, E. Garzón, P. Vargas, N. Moreno, R.Poutou/ INFLUENCE OF SODIUM GLUTAMATE, BUBBLING N2- GAS AND SUPERFICIAL AERATION ON TETANUS TOXIN PRODUCTION IN Clostridium tetani CULTURES/ ISSN: 0122-7483/ [Електронний ресурс]. [32].
	Глюкоза	8				
	NZ казеїн,	33,3				
	Рибофлавін,	0,00025				
	Піридоксин,	0,00025				
	Нікотинова кислота,	0,00025				
	Урацил	0,00125				
	L-цистин	0,125				
	K ₂ HPO ₄	1,1				
	CaCl ₂	0,8				
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1				
	NaCl	2,5				
Тіаміну гідрохлорат	0,00025					

Продовження таблиці 2.1

	Кальцій пантотенат	0,001				
	FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,032				
	Глутамату натрію	2,5				
<i>C. tetani</i> Harvard №. 49205	Середовище №2: Летема-Мюллера (Без глутамату натрію)					
	Глюкоза	48	8	25-40 Середнє 32,5	35 °C pH 6,8-7,4. Ферментер об'ємом 1 м3. Апарат оснащений установкою для термометра, заміром тиску, датчиком рН-метра. В ферментер подається азот для забезпечення анаеробних умов в процесі біосинтезу	Production, Optimization of Detoxification and Ammonium Sulphate Precipitation of Ultrafiltered Tetanus Toxin/ Solan (H.P.), Kasauli (H.P.), Dehradun (UK)/ [Електронний ресурс]. [47].
	NZ казеїн,	33,3				
	Рибофлавін,	0,00025				
	Піридоксин,	0,00025				
	Нікотинова кислота,	0,00025				
	Урацил	0,00125				
	L-цистин	0,125				
	K ₂ HPO ₄	1,1				
	CaCl ₂	0,8				
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1				
	NaCl	2,5				
	Тіаміну гідрохлорат	0,00025				

Закінчення таблиці 2.1

	Кальцій пантотенат	0,001				
	FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,032				
	Середовище №2 : Бикова печінка (декілька шматочків)	150				
<i>C.tetani</i> Колле 154			144	20	34 °C pH 6,8-7,4. Ферментер об'ємом 1 м3. Апарат оснащений установкою для термометра, заміром тиску, датчиком рН-метра. В ферментер подається азот для забезпечення анаеробних умов в процесі біосинтезу	Clostridium tetani growth and toxin production in the intestines of germfree rats/ C L Wells, E Balish/ DOI: 10.1128/iai.41.2.826-828.1983/ [Електронний ресурс] [49].

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг (л)	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3,4,5)*
1	2	3	4	5	6
<i>Clostridium tetani</i> <i>Massachusetts's</i>	Середовище №1: Летема-Мюллера				
	Глюкоза	8	70	0,56	1
	NZ казеїн,	33,3	640	21,312	2
	Рибофлавін,	0,00025	2100	0,000525	2
	Піридоксин,	0,00025	2400	0,0006	2
	Нікотинова кислота	0,00025	60	0,000015	5
	Урацил	0,00125	2750	0,0034	4
	L-цистин	0,125	1780	0,2225	3
	K ₂ HPO ₄	1,1	554	0,61	4
	CaCl ₂	0,8	69	0,0552	5
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1	460,80	0,046	5
	NaCl	2,5	106,75	0,267	5
	Тіаміну гідрохлорат	0,00025	1880	0,00047	2
	Кальцій пантотенат	0,001	690	0,0007	5
	FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,032	220,80	0,007	5
Глутамату натрію	2,5	108	0,27	1	

	Вартість 1 л середовища –23,35 грн				
<i>C. tetani</i> Harvard №. 49205	Середовище №1:				
	Глюкоза	8	70	0,56	1
	NZ казеїн,	33,3	640	21,312	2
	Рибофлавін,	0,00025	2100	0,000525	2
	Піридоксин,	0,00025	2400	0,0006	2
	Нікотинова кислота	0,00025	60	0,000015	5
	Урацил	0,00125	2750	0,0034	2
	L-цистин	0,125	1780	0,2225	3
	K ₂ HPO ₄	1,1	554	0,61	4
	CaCl ₂	0,8	69	0,0552	5
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1	460,80	0,046	5
	NaCl	2,5	106,75	0,267	5
	Тіаміну гідрохлорат	0,00025	1880	0,00047	2
	Кальцій пантотенат	0,001	690	0,0007	5
FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,032	220,80	0,007	5	

Вартість 1 л середовища –23,08 грн (23,1)					
<i>S.tetani</i> Колле 154	Середовище №3				
	3 бикової печінки				
	Бикова печінка (декілька шматочків)	150	100	15	7
	Глюкоза	5	70	0,35	1
	МПБ	5	1824	9,12	6
	Пептон	10	1200	12	6
Вартість 1 л середовища – 36,47 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на червень 2024 р. 1- <https://primehim.com/> ; 2- <https://xn--80afe0fub.com.ua/>, 3- <https://vetagrozhahist.com/ua/> 4-<https://prom.ua/ua/> 5- <https://shop.hlr.ua/ua/>; 6- <https://klebrig.com.ua/ua/> 7- <http://agar.com.ua/index.php?route=common/home> ;

Тільки невелике число елементів потребується організмам в відносно високих концентраціях: вуглець, кисень, водень та азот. Основні компоненти органічних сполук з яких побудована клітина.

Крім десяти головних біоелементів, мікроорганізмам необхідні мінорні біоелементи, джерелом яких, як правило, є водопровідна вода.

Сірка необхідна для синтезу амінокислот цистеїну та метіоніну, а також деяких коферментів. Фосфор входить до складу нуклеїнових кислот, фосфоліпідів, тейхоєвих кислот . Решта чотири головних біоелементи – це іони металів (калій, магній, кальцій, залізо), які є кофакторами ферментів і компонентами металокомплексів [40].

У наведених в таблицях 2.1 та 2.2 середовищах джерелам елементів є:

1. Середовище

Кислотний гідролізат казеїну – може бути джерелом багатьох елементів, але основними будуть: вуглець, водень, азот, кисень, сірка та фосфору. Загалом він використовувався як джерело азоту.

Глюкоза, як джерело основних сполук вуглець, водень, кисень.

Урацил та L-цистин – джерела таких елементів як: водень, карбон, нітроген, кисень та сірка.

Калій дигідрофосфат – джерело калію та фосфору.

Кальцій хлорид, натрій хлорид – джерело хлору, кальцію та натрію.

Магнієвий сульфат гептагідрат – джерело магнію та сульфуру.

Заліза 3 хлорид гексагідрат – джерело феруму ,

Глутамату натрію – джерело натрію, нітрогену.

Рибофлавін, піридоксин, нікотинова кислота є факторами росту.

2. Середовище

Друге середовище є ідентичним першому, тільки в ньому відсутній глутамат натрію. Отже, він не має додаткового джерела натрію, нітрогену.

3. Середовище

Бикова печінка - може бути джерелом багатьох елементів, але основними будуть: залізо, мідь, цинк, селен. А також різні вітаміни білки та жири.

Глюкоза – є джерелом вуглецю, водню та кисеню

МПБ - є джерелом фосфору, магнію, калію, кальцію .

Пептон - може бути джерелом багатьох елементів, але основними будуть: вуглець, водень, азот, кисень, сірка.

Загальна порівняльна таблиця середовищ

Біологічний агент	Концентрація тетаноспазміну Lf/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утворених за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л
1	2	3	4	5
<i>Clostridium tetani Massachusetts's</i>	43	82	0,524	23,35
<i>C. tetani Harvard №. 49205</i>	32,5	48	0,0677	23,8
<i>C.tetani Колле 154</i>	20	144	0,14	36,47

2.2. Обробка даних

Проаналізувавши данні, можна зробити висновок, що най перспективним штамом для виробництва правцевого анатоксину є штам *Massachusetts's*, культивованій на середовищі №1 , на другому місті буде штам *C. tetani Harvard №. 49205*, культивованій на середовищі №2.

Якщо, аналізувати з фінансової точкизору то най перспективним штамом буде все ж *Massachusetts's*. Хоча середовище для нього не є простим але саме ці компоненти підвищують вихід продукту.

Якщо, аналізувати зі швидкості культивування то *Harvard №. 49205*, культивованій на середовищі №2, має менший час культивування. А мойже всі компоненти середовища єдентичкі №1.

Усі штами мають високу імуногенну активність, володіє стабільними морфологічними та кільтурально-біохімічними властивостями.

Отже, можна зробити висновок про те, що найбільше в якості продуценту нам підходить штам *Massachusetts's*. Необхідно й далі вдосконалювати технологію отримання анатоксину, шляхом збільшення продуктивності виділених штамів та зменшенні цін на використовувані поживні середовища.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

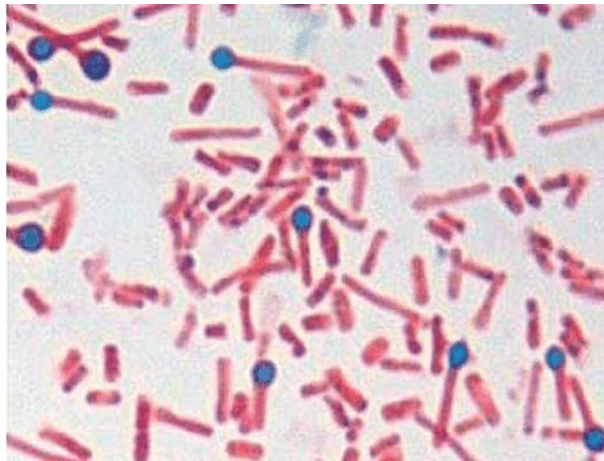


Рис 2.1 Спори та бактерії *Clostridium tetani* [7].

Clostridium tetani — велика ($3-12 \times 0,3-0,6$ мікрон), рухома за допомогою кількох джгутиків (перитрих) паличкоподібна бактерія. Є частиною роду облігатно-анаеробних, сапрофітних, грампозитивних організмів, добре відомих своєю здатністю виробляти токсини, що робить його одним із найнебезпечніших у своєму роді. Утворює овальні ендоспори, що перевищують діаметр клітини в 2-3 рази, розташовані термінально (характерна морфологія типу «барабанних паличок») [1].

Під впливом різних умов *C. tetani* може скинути джгутики і утворити спору. Кожна клітина може утворювати одну спору, як правило, на одному кінці клітини, надаючи клітині характерну форму барабанної палички. Спори *C. tetani*

надзвичайно витривалі і стійкі до нагрівання, різних антисептиків і кип'ятіння протягом кількох хвилин. Спори довгоживучі і поширені по всьому світу в ґрунтах, а також у кишечнику різноманітної худоби та тварин-компаньйонів [8].

Clostridium tetani — хемоорганогетеротроф. Для культивування на живильних середовищах необхідно забезпечувати анаеробні умови.

Використовують такі середовища для вирощування клостридій: рідке середовище КіттаТароцці, щільні поживні середовища (печінковий агар, залізусульфітний агар, цукрово-кров'яний агар Цейслера).

На твердих поживних середовищах утворюють дрібні прозорі колонії з неправильними краями, що через деякий час отримують скляний блиск. Наприклад на цукрово-кров'яному агарі (рис 5.2.) [8].

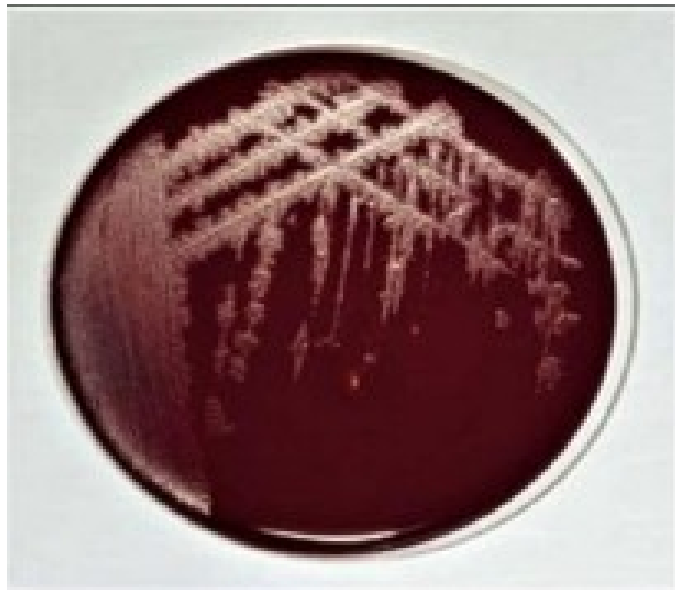


Рис 2.2 Ріст *Clostridium tetani* на цукрово-кров'яному агарі [8]

У рідких живильних середовищах бактерія росте, утворюючи слабе помутніння і легкий шар пилоподібного осаду на стінках пробірки. Наприклад рідке середовище Кітта Тароцці (рис 5.3).



Рис. 2.3 ріст клостридій в рідкому середовищі Кітта Тароцці [8].

При уколі в товщу щільного живильного середовища утворює дрібні колонії, схожі на шматочки вати. Розріджує желатин з газоутворенням. Не ферментує вуглеводів [1].

Clostridium tetani облігантний анаероб. Найкраще росте при температурі від 33 до 37°C. За типом живлення – хемоорганогетеротроф. Може рости за наявності натрію хлориду , натрію гідрогенфосфату , калію дигідрофосфату [8].

pH середовища 7,4-7,9. Розріджує желатин повільно. Протеоліз супроводжується утворенням сірководню, аміаку. Деякі штами ферментують глюкозу, мальтозу, сахарозу [9].

C. tetani потрапивши до рани вивільняє токсини тетанолізін і тетаноспазмін у міру лізу клітин. Тетаноспазмін , що володіє нейротоксичними властивостями, тетанолізін володіє гемолітичними властивостями [1].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Clostridium tetani* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [1].

Домен – Бактерії (Bacteria)

Тип – Firmicutes

Клас – Clostridia

Ряд – Clostridiales

Родина – Clostridiaceae

Рід – Clostridium

Вид – Clostridium tetani

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба в цільовому продукті – правцевому анатоксину

У сучасному світі потреба у продуктах біосинтезу, таких як тетаноспазмін, відіграє критичну роль у забезпеченні здоров'я людства. Тетаноспазмін, відомий як ключовий компонент вакцини проти тетануса, має широкі сфери застосування, що охоплюють медицину галузь, громадську охорону здоров'я та промисловість.

У медицині тетаноспазмін виступає як основний інструмент у профілактиці тетанусу. Вакцинація, заснована на цьому білку, є ключовою стратегією для запобігання серйозному інфекційному захворюванню. Вона не тільки забезпечує захист від тетанусу через формування імунітету, а й служить основою для програм вакцинації, включаючи захист новонароджених через вакцинацію вагітних жінок.

Зазвичай використовують АДП-М вакцину (АДП-М – адсорбований дифтерійно-правцевий анатоксин зі зменшеним вмістом антигенів). Завдяки поєднанню анатоксинів одна вакцина може разом захищати людину як від дифтерії так і правця, ревакцинація рекомендована кожні 10 років [10].

Діючими компонентами є дифтерійний та правцевий анатоксини по 5 одиниць за 1 дозу (0,5мл). (Інші допоміжні речовини: алюмінію гідроксид, тіомерсал як консервант та ін). Вакцину вводять глибоко внутрішньом'язово в ділянку дельтоподібного м'яза в кількості 0,5 мл (разова доза). Перед введенням ампулу ретельно струсити до одержання гомогенної суспензії [11], [10].

Також для вакцинації дітей віком до 7 місяців використовують АКДП вакцину (адсорбовану коклюшно-дифтерійно-правцеву вакцину).

					НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб</i>		Соколова О.А.			<i>РОЗДІЛ 3. ТЕО</i>			
<i>Перевір.</i>		Пенчук Ю.М.					30	99
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ 30		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.						

Діючими компонентами є кашлюкові бактерії - 10 міжнародних оптичних одиниць (МОО), анатоксин дифтерійний очищений концентрований (отриманий шляхом інактивації токсину формальдегідом) - 15 флокулюючих одиниць (Lf), анатоксин правцевий очищений концентрований (отриманий шляхом інактивації токсину формальдегідом) - 5 одиниць зв'язування (ОЗ).

Вакцину приймають згідно Національного календаря щеплень вакцинація АКДП-Біолік проводиться за віком у 3 місяці (перше щеплення), 4 місяці (друге щеплення), 5 місяців (третє щеплення) та 18 місяців (четверте щеплення). Інтервал між першим і другим, другим і третім щепленнями АКДП-вакцина становить щонайменше 1 місяць [12].

У контексті материнської медицини тетаноспазмін забезпечує безпеку новонароджених, запобігаючи передачі тетануса від матері до дитини. Це стає важливим елементом стратегії зниження смертності та захворюваності серед новонароджених.

В галузі громадської охорони здоров'я тетаноспазмін відіграє важливу роль у запобіганні спалахам правця. Колективний імунітет, що забезпечується вакцинацією, є критичним фактором в управлінні громадським здоров'ям та запобіганні поширенню захворювання. Охоплення вакцинацією на рівні 95% населення країни дає можливість забезпечити повноцінний захист населення від спалахів та епідемій інфекційних хвороб, яким можна запобігти щепленнями, — це називається колективним імунітетом. У разі зниження популяційного імунітету рівень захворюваності на інфекції, проти яких

здійснюють вакцинацію, зростає [13].

Промисловий рівень виробництва правцевого анатоксину забезпечує стабільне та якісне поставлення препаратів для масової вакцинації. Це особливо важливо в умовах, коли зіткнення з збудником може статися в будь-якому середовищі, і

необхідність надійного захисту стає невідкладною. Масове виробництво дозволяє знизити витрати на вакцинацію та розширити її охоплення, забезпечуючи захист для більшої кількості людей. Це також призводить до зниження економічного навантаження на системи охорони здоров'я, оскільки профілактичні заходи дешевші та ефективніші, ніж лікування гострої інфекції.

Таким чином, потреба в тетаноспазміні обумовлена не лише необхідністю запобігання інфекції, а й забезпеченням сталого та ефективного підходу до боротьби з цим інфекційним захворюванням у різних сферах життя людини. Розвиток та вдосконалення технологій біосинтезу тетаноспазміну стає стратегічно важливим для забезпечення доступності, якості та безпеки цього важливого медичного продукту.

Таблиця 3.1

Тип вакцини	Група пацієнтів	Доза препарату на одне щеплення	Вміст правцевого анатоксину в дозі препарату	Кількість щеплень	Кількість правцевого анатоксину на 1 людину, ОЗ	Середній процент вакцинації Населення 2015-2018 роки	Загальна кількість препарату яку отримують люди
АКДП-вакцина	Діти віком до 5 міс.	0,5 мл	5 одиниць зв'язування (ОЗ);	4 рази	20 ОЗ	70%	Понад 4 млн ОЗ 1354570
АДП-М вакцина	Діти від 7 років та підлітки	0,5 мл	5 одиниць зв'язування (ОЗ);	2 рази	10 ОЗ	53%	Понад 93 млн ОЗ 34185000
						Всього	35539570 ОЗ/рік

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в інактивованому тетаноспазміні

Примітка. Для розрахунку взято до уваги такі данні як :

1. Дозування АДП-М та АКДП-вакцин взяте із їх офіційних інструкцій [6] ,[9], [21] .
2. Кількість щепленні розрахована згідно Національного календаря щеплень та порадами МОЗ України [13] ,[15].
3. Данні про процент вакцинації взяті з праці «Гудзевич Л.С. Стан вакцинопрофілактики дифтерії та правця в Україні джерела» [16].
4. Розрахунок загальної кількості препарату яку отримують люди підраховувався приблизно з урахуванням численності населення України в 42 664, 5 млн [17].
5. Розрахунок загальної кількості препарату за віковими групами був приблизно вирахований за віковою статистикою населення [18].
6. Перерахунок ОЗ в л проходив за наступними даними:
Адсорбована коклюшно-дифтерійно-правцева вакцина (АКДП-вакцина.) вміщує в 1мл 10 одиниць зв'язування (ОЗ) правцевою анатоксину. Адсорбований дифтерійно-правцевий анатоксин зі зменшеною концентрацією антигенів (АДП-анатоксин) вміщує в 1мл 10 ОЗ правцевого анатоксину [19].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Зараз в Україні є три підприємства, на потужностях яких випускалися або іноді продовжують випускатися вакцини, - це львівське підприємство «PharmaLife», харківський "Фармстандарт-Біолік" та бориспільський "Фармекс Груп". Правда, виробляється на цих підприємствах обмежену кількість вакцин і, як правило, з

розфасовкою імпортої сировини за ампулам або картонних упаковках. Тобто, основний технологічний процес здійснюється за кордоном [20].

Також згідно з Державним реєстром лікарських засобів, більшість вакцин які містять тетаноспазмін на ринку України є імпортними [21].

На основі даних Державної митної служби України , частка імпорту противопрацевих вакцин приблизно становить 73%.[22].

Згідно з попередніми розрахунками (див. п.1.1), потреба в тетаноспазміні як компоненту вакцин становить 35 539 570 ОЗ/рік

Обраний біологічний агент *C.tetani Massachusetts's* синтезує тетаноспазмін в концентрації в 43 Lf/мл в 1,0535 г/л біомаси.

Умовно приймаємо концентрацію білку за 0,1% (від біомаси), тоді концентрація білку буде дорівнювати:

$$1,0535 \times (0,1/100) = 0,001 \text{ г/л}$$

Тоді умовно приймаємо 43000 ОЗ = 0,001 г/л біомаси . Отже, маса білку в 35 539 570 ОЗ/рік становить:

$$0,001 \text{ г/л} - 43000 \text{ ОЗ}$$

$$X \text{ г/л} - 35 539 570 \text{ ОЗ/рік}$$

$$X = 0,82 \text{ г}$$

Отже, кількість біомаси буде дорівнювати :

$$0,01 - 1,0535 \text{ г}$$

$$0,82 - x \text{ г}$$

$$X = 86,4 \text{ г}$$

Кількість КР:

$$1,0535 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$86,4 \text{ г} - x$$

$$X = 82 \text{ л/рік}$$

Процес виділення тетаноспазміну включає такі стадії:

- Центрифугування - виділений вміст піддають центрифугуванню для розділення твердих клітинних залишків від рідини, що містить токсин.
- Фільтрація - щоб додатково очистити рідину від залишків клітин та інших частинок, може бути використана фільтрація. Це допомагає отримати чистий розчин, що містить тетаноспазмін.

Орієнтовні величини втрат цільового продукту на цих стадіях виробництва буде дорівнювати приблизно 5% [22].

$$V_{\text{кр}} = 82 \times 1,05 = 86 \text{ л (умовно 90 л для більш зручного підрахунку циклів)}$$

3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення річної потреби у тетаноспазміні потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 90 л культуральної рідини. Нам знадобиться 9 циклів ферментації. Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, який триває 82 години, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 75, тоді об'єм культуральної рідини за добу буде вираховуватися по формулі і становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}}$$

$$86 / 75 = 1,14 \text{ л}$$

Де $V_{\text{гп}}$ – це об'єм культуральної рідини а $T_{\text{тр}}$ – це кількість робочих днів.

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{к}} + T_{\text{пр}}$$

Також, обрахуємо цикл роботи ферментера за даною формулою:

$$82 + 8,5 = 90,5 \text{ год}$$

Де $T_{\text{к}}$ – це тривалість культивування а $T_{\text{пр}}$ – це час підготовки ферментера. Який складається з : миття та огляду приблизною тривалістю 1,5 год, перевірки на герметичність - 1 год, підігріву апарату - 0,5 год, стерилізації - 1 год, охолодження - 1 год, завантаження середовища - 2 год, засіву - 0,5 год та вивантаження культуральної рідини - 1 год. Отже, увесь процес складе приблизно 8,5 годин.

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_{\text{д}} * T_{\text{цф}}) / 24$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$(1,5 \times 1,14 \times 90,5) / 24 = 6,45 \text{ л/цик}$$

Де K_1 – це коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій може бути від 1,1...1,5. $V_{\text{д}}$ – це об'єм культуральної рідини за добу. $T_{\text{цф}}$ – це цикл роботи ферментера.

Визначивши об'єм кількості продукту за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 (0,8), визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_3 ;$$
$$6,78 / 0,8 = 8,0625 \text{ л} = 8 \text{ л}$$

Де $V_{\text{цк}}$ – це об'єм кількості продукту за один цикл, K_3 – це коефіцієнт заповнення.

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $0,01 \text{ м}^3$ (10 л)

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 8 / 10 = 0,8 \text{ – не перевищує границь норми заданого значення.}$$

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримують 6,45 л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), які зазвичай становлять від 10 - 15%.

Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{цк}} \cdot (1 + E_{\phi})$$

$$6,45 \times 1,1 = 7,1 \text{ л}$$

Де $V_{\text{цк}}$ – це об'єм кількості продукту за один цикл, E_{ϕ} – це втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 7,1 л. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,8 геометричний об'єм ферментера буде становити:

$$V_{\phi} = 7,1 / 0,8 = 8,8 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст1}} = 0,010 \text{ м}^3$ (10 л)

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 8,8 / 10 = 0,88$$

Уточнений коефіцієнт заповнення показує не значні відхилення. Отже, геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{роб1} = 7,1$ л середовища необхідно приготувати:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} \cdot X_{ф}$$

$$7,1 \times 0,1 = 0,71 \text{ л (710 мл) посівного матеріалу.}$$

Де $V_{роб1}$ – це об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом, $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1}$$

$$7,1 - 0,71 = 6,4 \text{ л}$$

Де $V_{роб1}$ – це об'єм поживного середовища та посівного матеріалу, $V_{пм1}$ – це кількість посівного матеріалу.

Одержання посівного матеріалу, $V_{пм1} = 710$ мл для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 500$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

$$N_{колб} = V_{пм3} / (V_{колб} * K_{зк})$$

$$710 / (500 \times 0,2) = 7 \text{ колб}$$

Де $V_{пм3}$ – це кількість посівного матеріалу.

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу тетаноспазміну бактеріями *C.tetani Massachusetts's* необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом $0,010 \text{ м}^3$ та 7 качалочних колб по 500 мл.

Для наочності розрахунки кількості стадій підготовки посівного матеріалу та об'ємів необхідного обладнання сформовані у вигляді підсумкової таблиці (табл 1.2)

Таблиця 3.2.

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини V_{кр} (л,мл)	Уточнений об'єм культуральної рідини V_{роб} (л,мл)	Об'єм посівного матеріалу V_{пм} (мл)	Об'єм поживного середовища V_{пс} (л мл)	Коефіцієнт заповнення K_{зап} частка	Геометричний об'єм ферментера, V_{ст} (л)
1	2	3	4	5	6	7
2	86 л	7,1 л	710 мл	6,4 л	0,8	10 л
1	710 мл	710 мл	-	710 мл	0,2	7 колби

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Не ферментує вуглеводів, розріджує желатин (на 5–12-у добу інкубації) з утворенням ялинкоподібного росту і газу. Не виробляє сірководень, не відновлює нітрати. Якщо посіяти *C. tetani* на середовище Мак-Конкі (його колір нейтральний червоний), воно дасть зелену флюоресценцію [8].

Clostridium tetani Massachusetts's подається гліколізу (шлях Ембдена-Мейергофа), глюкоза перетворюється на піруват.

Гліколіз - це процес перетворення глюкози в піруват і генерування невеликих кількостей АТФ і NADH . Це центральний шлях, який виробляє важливі метаболіти-попередники: шестивуглецеві сполуки глюкози, фруктози, тривуглецеві сполуки гліцеролу гліцеральдегід, гліцерат, фосфоенолпірувату та пірувату.

Ацетил-КоА, інший важливий метаболіт-попередник, утворюється шляхом окисного декарбосилування пірувату .

Глюконеогенез - це шлях синтезу глюкози з неуглеводних попередників. По суті, це зміна гліколізу з незначними варіаціями альтернативних шляхів.

Окисне декарбосилування пірувату до ацетил-КоА каталізується піруватдегідрогеназним комплексом як частиною аеробного дихання або піруват : ферредоксиноксидоредуктазою [12].

					НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Соколова О.А.					39	99
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		40

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

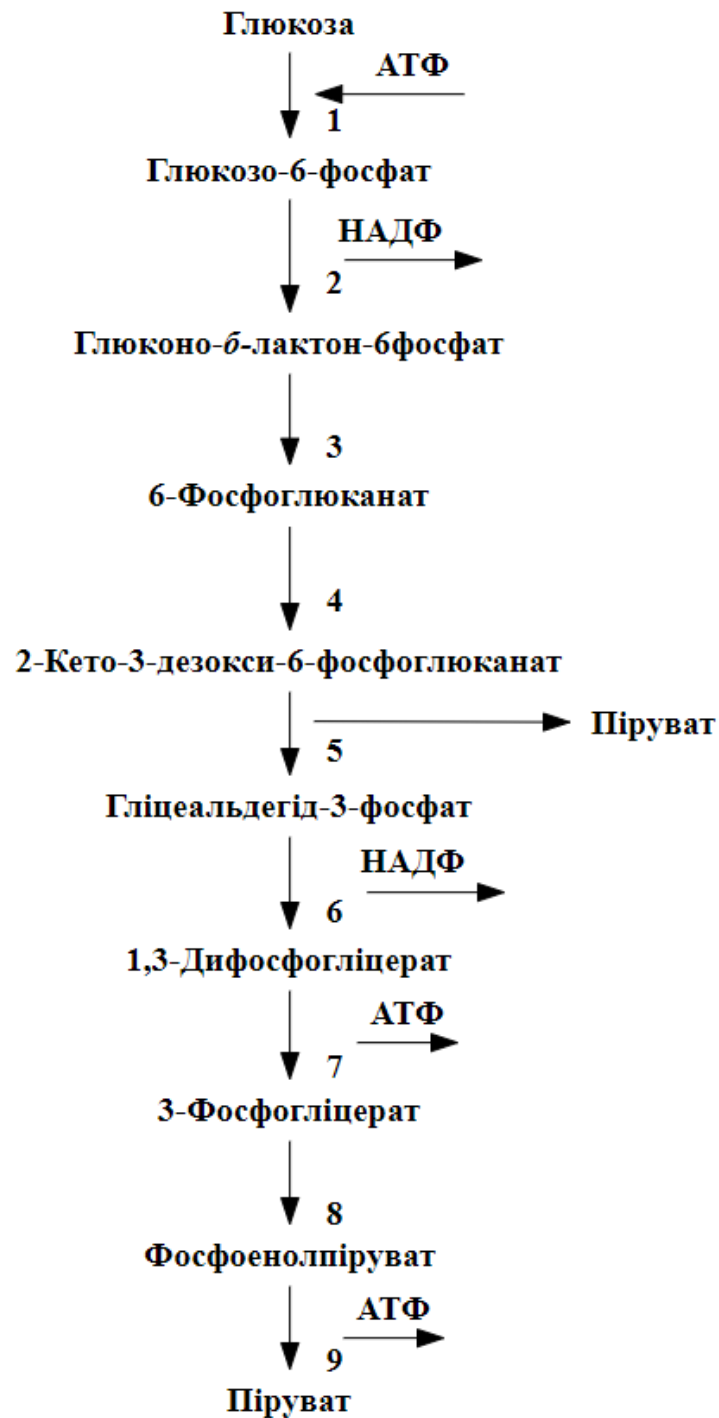
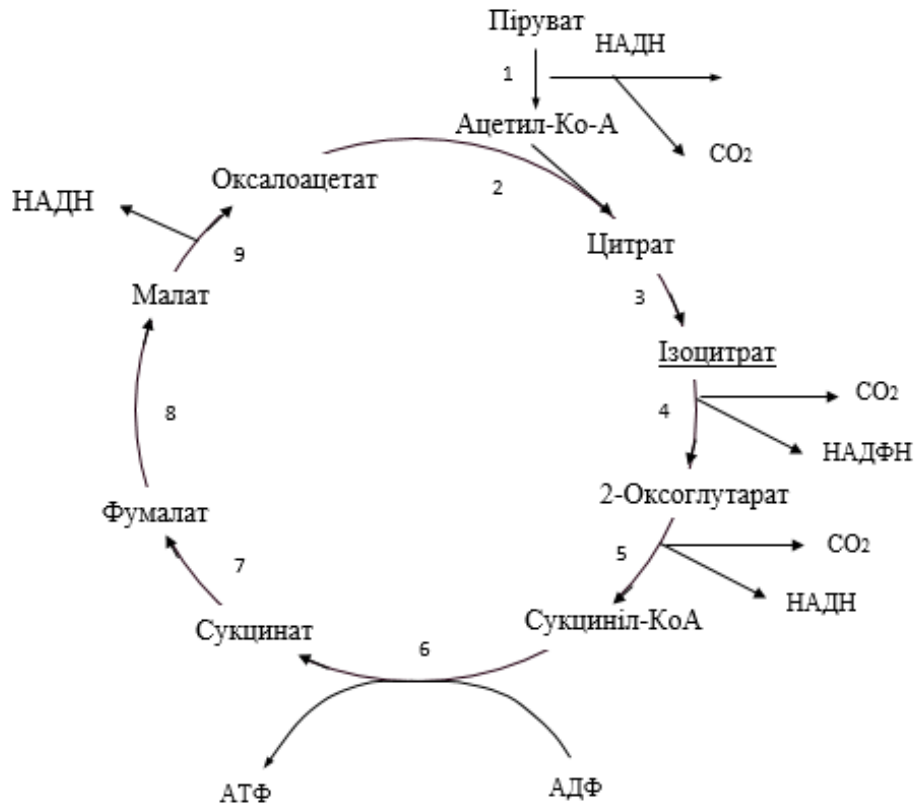


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ентнера – Дудорова

Ферменти: 1 – гексокіназа; 2 – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; 3 – лактоназа;
 4 – фосфоглюконатдегідратаза; 5 – альдолаза; 6 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа;
 7 – фосфогліцераткіназа; 8 – гліцератфосфомутаза, фосфогліцератфосфомутаза та енолаза; 9 – піруваткіназа



[40].

Рис. 4.2. Цикл трикарбонних кислот

Ферменти: 1 – піруватдегідрогеназа; 2 – цитратсинтаза; 3 – аконітаза; 4 – ізоцитратдегідрогеназа; 5 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа; 6 – сукцинаттіокіназа; 7 – сукцинатдегідрогеназа; 8 – фумараза; 9 – малатдегідрогеназа [40].

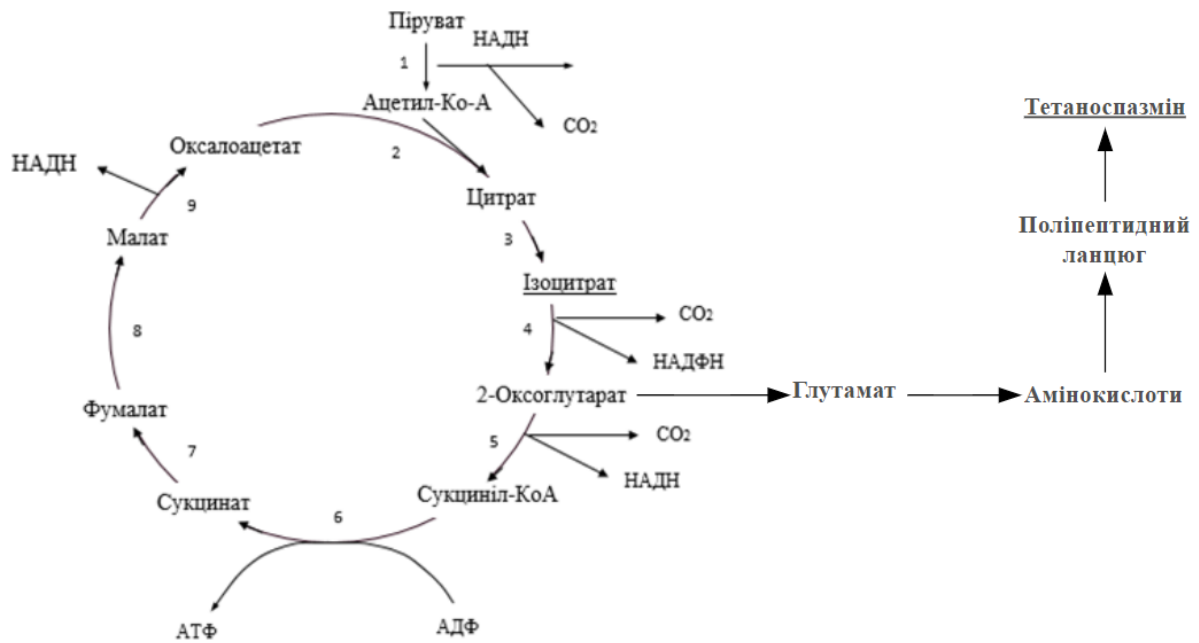


Рис. 4.3. Шлях синтез тетаноспазміну

2-Оксоглутарат бере участь у синтезі глутамату, який є важливим у багатьох трансамінаційних реакціях, що ведуть до виробництва інших амінокислот. Глутамат та інші амінокислоти, що утворюються з його допомогою, згодом інтегруються у поліпептидний ланцюг тетаноспазміну.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

Бактерія *Clostridium tetani* є облигантним анаеробом.

Облігатні анаероби — організми, які живуть і ростуть тільки за відсутності молекулярного кисню в середовищі. Кисень не лише перешкоджає росту але і є згубним для бактерій. Тому для біосинтезу нам потрібно забезпечити анаеробні умови, на виробництві їх створюють шляхом герметизації апаратури, продуванням середовища інертними газами. В якості такого газу візьмемо азот.

5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Clostridium tetani — хемоорганогетеротроф. Для культивування на живильних середовищах необхідно забезпечувати анаеробні умови.

Культивування бактерії яка викликає тетанус, зазвичай відбувається в умовно асептичних умовах. Однак умовно асептичні умови включають певні стерильні заходи, щоб запобігти інфекції та забезпечити чистоту культури, але вони не так суворі, як асептичні умови, які вимагають повної стерильності. Крім того, культура зазвичай обробляється стерильними методами, і вміст анаеробного середовища стежиться, щоб уникнути забруднення.

Культивування *Clostridium tetani* вимагає підживлення у виробництві чи дослідницьких лабораторіях. Це живильне середовище зазвичай містить набір амінокислот, вуглеводів, вітамінів і мінеральних солей, необхідних для метаболічних процесів та росту бактерій.

Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ			
Розроб.		Соколова О.А.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркуші
Перевір.		Пенчук Ю.М.					43	99
Реценз.						Кафедра БТМ 44		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Правцева паличка на твердих живильних середовищах утворює дрібні прозорі колонії з неправильними краями, що через деякий час отримують скляний блиск. Наприклад на цукрово-кров'яному агарі.

На щільних поживних середовищах - цукрово-кров'яному агарі і печінковому агарі - правцева паличка росте тільки при повному видаленні кисню, тому для культивування треба використовувати анаеростат [8].

У рідких живильних середовищах бактерія росте, утворюючи слабе помутніння і легкий шар пилоподібного осаду на стінках пробірки. Наприклад рідке середовище Кітта Тароці.

Культивування *Clostridium tetani* зазвичай проводять напівбезперервним методом. Це означає, що бактерії культивуються в певних умовах, і після досягнення певної концентрації або стадії росту, культура може бути використана для виробництва токсину тетанусу.

Процес напівбезперервного культивування передбачає подачу живильних речовин та керування умовами, щоб забезпечити оптимальний ріст бактерій. Після досягнення бажаного обсягу культури, бактерії можуть бути вилучені, і продукт - TeNT може бути виділений.

Саме такий метод дозволяє підтримувати культуру *Clostridium tetani* в стані активності та ефективно використовувати її для виробництва токсину, зберігаючи при цьому живильне середовище та інші умови на оптимальному рівні.

Clostridium найкраще росте при температурі від 33 до 37°C. За типом живлення – хемоорганогетеротроф. Може рости за наявності натрію хлориду, натрію гідрогенфосфату, калію дигідрофосфату [1].

pH середовища 7,4-7,9. Розріджує желатин повільно. Протеоліз супроводжується утворенням сірководню, аміаку. Деякі штами ферментують глюкозу, мальтозу, сахарозу [1].

C. tetani потрапивши до рани вивільняє токсини тетанолізін і тетаноспазмін у міру лізу клітин. Тетаноспазмін, що володіє нейротоксичними властивостями, тетанолізін володіє гемолітичними властивостями [1].

Специфіка полягає в тому, що культивується патогенно небезпечний мікроорганізм, спори стійкі до хімічних і фізичних дій, вони виживають протягом 8-10 год в 1 % розчині сулеми і 5 % розчині фенолу, а також витримують кип'ятіння протягом 0,5-1 год, тому це вимагає додаткових правил роботи з патогенними мікроорганізмами. Наприклад, персонал має бути захищеним (халат, маска, рукавички, захисні окуляри), робота повинна проводитися в спеціальних боксах або приміщеннях з обмеженою доступністю, не проводити піпетування ротом - використовувати відповідні механічні пристрої, а також інші відомі правила безпеки під час роботи з даним мікроорганізмом [48].

Для культивування даного мікроорганізму обираємо ферментер марки New Brunswick BioFlo310 (рис.3.3), об'ємом на 10 л. Даний біореактор має:

- Робочий об'єм 0.8 - 10.5 л
- Універсальна лабораторна система, що повністю відповідає вимогам cGMP.
- Підходить для культивування будь-яких ліній клітин в аеробних чи анаеробних середовищах.
- Має інтуїтивно-зрозуміле керуюче програмне забезпечення New Brunswick та інтерфейс з застосуванням сенсорного екрана.
- Настроюваний користувачем екран для відстеження тенденцій для реєстрації даних та контролю за обраними процесами.
- Великий вибір крильчаток, опцій подачі газів, додаткових сенсорів робить більш простим процес культивування.
- Має 7 додаткових аналогових вхідних/вихідних з'єднань для інтеграції допоміжного обладнання.

Завдяки можливості ферментеру New Brunswick BioFlo310, такій як, опції подачі газу, ферментер чудово полегшує культивування облигантний анаероб,



Рис 5.1. Ферментер New Brunswick BioFlo310. Робочий об'єм 0.8 - 10.5 л [34].

таких як *Clostridium tetani*.

5.2. Обґрунтування стадій підготовки азоту

Культивування мікроорганізмів в строго анаеробних умовах вимагає зовсім інших методів і обладнання в порівнянні з культивуванням аеробних організмів. Тому для культивування *Clostridium tetani* ми повинні обрати ферментер в якому процес культивування відбувається під тиском азоту [24].

Оскільки облигато-анаеробні організми не здатні рости під впливом кисню, нема необхідності при біотехнологічних процесах проводити аерацію в посівному апараті. Для створення анаеробних умов під час виробничого біосинтезу

забезпечують подачу азоту у біореактор. В такому випадку в технологічній схемі передбачається підготовка азоту, яка включає його подачу від балону до інокулятора та ферментера, при цьому відбувається очищення азоту в індивідуальних фільтрах [25].

З анаеростатів відкачують повітря, а потім заповнюють сумішшю азоту (80-90%) та вуглекислого газу (10-20%), за рахунок якої створюється надлишковий тиск, який перешкоджає проникненню кисню з повітря [24].

Ферментер де є автоматична подача газу культуральної рідини забезпечується шляхом подачі через автоматичні витратоміри газів, який встановлений у нижній частині ферментера [26].

Підготовка азоту для використання у культивуванні *Clostridium tetani* в анаеробних умовах включає кілька етапів:

- Очищення азоту від забруднень.

Вихідний азот може містити домішки та забруднення, які можуть впливати на культивування бактерій. Очищення зазвичай проводять через фільтрацію або інші методи очищення, щоб отримати чистий азот.

Фільтр для фільтрування повітря або газів під час культивування *Clostridium tetani* повинен мати мінімальний розмір пор, щоб уникнути контамінації культури і забезпечити оптимальні умови для росту мікроорганізмів. Оскільки *Clostridium tetani* є анаеробним бактеріальним видом, важливо, щоб фільтр був здатний утримувати аеробні мікроорганізми та допомагав утримувати анаеробні умови в середовищі культивування.

Нам підійде мембранні фільтри з поліетерсульфону (PES), який має такі технічні характеристики мембран :

Таблиця 5.1.

Діаметр пор (µm)	Точка кипіння (Bar)	Швидкість потоку води (мл/хв/см ²)	Швидкість потоку повітря (мл/хв/см ²)
0,22	3,4	30	16000
0,45	2,7	21	16000

Примітка – усі данні по технічним характеристикам взяті з сайту МАНКОР:

Лабораторний посуд і обладнання [27].

- Усунення кисню.

Для створення анаеробних умов важливо видалити кисень із середовища. Це може виконуватися шляхом проходження азоту через каталізатор. Завдяки так званому "продуванню" з середовище можна усунути кисень, просто витиснувши його с середовища.

- Усунення вологи.

Забезпечення сухості азоту важливо для уникнення утворення конденсату, який може впливати на анаеробні умови. Це може бути досягнуто за допомогою використання сушильних колонок або інших систем видалення вологи.

- Вимірювання та регулювання тиску.

Важливо вимірювати та контролювати тиск азоту у системі. Це може виконуватися за допомогою редукторів тиску, які забезпечують необхідний тиск для оптимального культивування бактерій.

- Додавання азоту до культурального середовища.

Завершення підготовки полягає у подачі підготовленого азоту до культивуємого середовища. Це може включати системи подачі газу з регульованим потоком.

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

При роботі з високо патогенними мікроорганізмами, особливо в лабораторних умовах, важливо використовувати ефективні дезінфікуючі засоби, щоб забезпечити безпеку персоналу та запобігти поширенню інфекцій.

5.3.1 Характеристика миючих засобів

Мікробак форте (Mikrobac forte) — засіб на основі амінів для дезінфекції та очищення поверхонь і виробів медичного призначення, що має сильну очищувальну дію навіть при високому білковому навантаженні [28].

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас %.

Діючі речовини: бензил-С12-18-алкілдиметиламоній хлорид – 18,6-21,2; N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан -1,3-діамін – 4,5-5,5;

Допоміжні речовини: детергенти, інгібітор корозії, регулятор піноутворення, гідротропна речовина, ароматизатор, вода – до 100,0. 1.4.

Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу.

Прозора рідина від світло-жовтого до світло-рожевого кольору, злегкаароматизована. Густина (20°C) – 1,006-1,014 г/см³. Значення рН – 8,0-9,0. Засіб добре змішується з водою у будь-яких співвідношеннях. Засіб біологічно розпадається. Розчини засобу Мікробак форте мають досконалі миючі властивості, добре змочують поверхні, не пошкоджують об'єкти, які обробляються,

видаляють забруднення органічного походження, у т.ч. білкові, жирові, залишки крові, а також забруднення від лікарських препаратів тощо. Робочі розчини не викликають корозії об'єктів, виготовлених з нержавіючої сталі, алюмінію, міді, латуні, не пошкоджують керамічні поверхні, вироби з поліаміду, поліетилену, поліпропілену, полістиролу, поліуретану, полівінілхлориду, акрил бутадієнстиролу, силікону, резини, латексу, акрилового скла, тefлону, плексигласу та інших полімерних матеріалів [29].

Актацид хлор - є потужним дезінфекційним засобом, що забезпечує ефективну санітарну обробку в різних умовах, при цьому вимагає обережності у використанні через свою хімічну активність. (Засіб дезінфікуючий за ТУ У 24.2-37063202-003:2010).

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %.

2,4-імідазолідіндіон - 1,3-дихлор-5,5-диметил - 7,0÷13,0 (діюча речовина); 2,4-імідазолідіндіон-5,5-диметил; натрій триполіфосфату; аніонні ПАР; натрій карбонату; натрій хлористий; інгібітор корозії та інші функціональні добавки.

Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу.

Актацид хлор випускається у вигляді білого або злегка жовтуватого порошку та таблеток, які розчиняються у воді. Він має характерний запах хлору при розчиненні. Засіб добре розчиняється у воді, утворюючи прозорий або злегка мутний розчин. Основною діючою речовиною є натрій дихлорізоціанурат, який при розчиненні утворює активний хлор. Робочий розчин має рН від слабокислого до нейтрального (зазвичай 5-7). Актацид хлор ефективний проти широкого спектру мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси та грибки.

Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, виготовлені з корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю,

порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, корозійностійким гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту. Гомогенізують мокротиння та інші виділення. Робочі розчини засобу «Актацид хлор» пожежо- та вибухобезпечні.

Дезмакс – засіб для дезінфекцій, чищення та знезараження поверхонь. Виявляє протимікробну активність щодо грам негативних та грам позитивних бактерій, вірусів, аденовірусів, ентеровірусів, коронавірусів та ін.

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас %.

Дихлорізоціанурат натрію - не більше 28 (діюча речовина), регулятор рН та інгібітор корозії - не більше 10,0, диспергатор - не більше 6,0, стабілізатор - не більше 3,0. Вміст активного хлору - не менше 14,0%.

Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу.

Засіб "Дезмакс" таблетки випускають у вигляді таблеток з гладкою поверхнею круглої правильної форми білого кольору масою $2,70 \pm 0,5$ г, на яких нанесені позначки у вигляді округлої хрестоподібні для поділу таблетки на дві та чотири рівні частини або гладкі, та дрібних гранул меш 8-30 білого кольору із запахом хлору [30], [31].

5.3.2 Характеристика витрат миючих та дезинфікуючих засобів

Для визначення поверхонь, які мають митись та дезинфікуватись, скористаємось специфікацією обладнання, де вказані його габаритні розміри. У ферментаційному відділенні встановлені інокулятор та виробничий ферментер. Загальна площа приміщення, де встановлено дане обладнання становить $6 \text{ м} \times 3$

м. Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту 1,8 м, загальна площа обробки складе.

$$\Sigma F = (6 \text{ м} \times 3 \text{ м}) + (6 \text{ м} + 6 \text{ м} + 3 \text{ м} + 3 \text{ м}) \times 1,8 \text{ м} = 18 \text{ м}^2 + 32,4 \text{ м}^2 = 50,4 \text{ м}^2$$

Таблиця 5.2.

Узагальнена характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва тетаноспазміну

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(к)	Вартість 1 л роб. розчину мийного або дез. засобу, Грн/л	Витрати роб. розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчину, Едз, Грн/м ²
Мікробак форте	Поверхні, стіни, вікна, двері	0,25	766	1,915	0,2	19,3
Дезмакс	Стіни та підлога, поверхні обладнання.	0,2	330	0,66	0,2	6,65
Актацид хлор	поверхні обладнання стіни, вікна, двері, підлога	0,2	370	0,74	0,2	7,46

Після аналізу результатів, викладених у *Таблиці 2.1*, ми вирішили вибрати "Дезмакс" як найбільш ефективний дезінфікуючий засіб. Важливо зазначити, що з часом рекомендується змінювати типи дезінфікуючих засобів. Це необхідно через те, що стороння мікробіота може адаптуватися до конкретного дезінфікуючого засобу з плином часу. Такий підхід дозволяє забезпечити ефективність процесу дезінфекції та запобігти розвитку резистентності мікроорганізмів до використовуваних засобів.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування *Clostridium tetani Massachusetts's*.

Згідно зі здійсненими в розділі 1 розрахунками, виробничий біосинтез тетаноспазмину проходить у ферментері об'ємом 0,01 м³, що містить 6 л поживного середовища.

Інокулянт отримують у два етапи: у колбах на качалці, і в ферментерах об'ємом 10 л (6 л).

Для виробничого біосинтезу тетаноспазмину *Clostridium tetani* культивують використовуючи середовище такого складу (г/л):

- NZ казеїн – 33,3
- K₂HPO₄ – 1,1
- CaCl₂ - 0,8
- Глюкоза - 8,0
- MgSO₄ × 7H₂O - 0,1
- NaCl - 2,5
- Тіаміну гідрохлорат - 0,00025

- Рибофлавін - 0,00025
- Піридоксин - 0,00025
- Кальцій пантотенат - 0,001
- Нікотинова кислота - 0,00025
- Урацил - 0,00125
- L-цистин - 0,125
- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,032
- Глутамату натрію – 2,5
- рН середовища – 6,8-7,4.

Всі компоненти поживного середовища для вирощування бактерії *C.tetani* проходять стерилізацію, але з метою збереження поживних речовин у максимально придатному для споживання стані, процес стерилізації умовно поділяємо на такі композиції (залежно від режимів стерилізації):

Композиція А - глюкоза (у вигляді розчину; режим стерилізації 112°C протягом 30 хвилин, тиск 0,05 МПа).

Композиція Б – NZ казеїн, рибофлавін, піридоксин, нікотинова кислота, урацил, L-цистин, (112°C, 30 хв. при P=0,05 МПа)

Композиція С – калій дигідрофосфат, кальцій хлорид, магнієвий сульфат гептагідрат, натрій хлорид, тіамін гідрохлорат, кальцій пантотенат, заліза 3 хлорид гексагідрат, глутамату натрію (131°C, 60 хв. при P=0,15 МПа).

Таблиця 5.3.

Розрахунок вмісту компонентів композиції В у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л, мл	NZ казеїн г	Рибофлавін г	Піридоксин г	Нікотинова к-та г	Урацил г	Л-цистин г
710 мл	23,643	0,0001775	0,0001775	0,0001775	0,0008875	0,08875
6,4 л	213,12	0,0016	0,0016	0,0016	0,008	0,8

Таблиця 5.4.

Розрахунок вмісту компонентів композиції С у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л, мл	K ₂ HPO ₄ г	CaCl ₂ г	MgSO ₄ × 7H ₂ O г	NaCl г	Тіаміну гідрохлорат г	Кальцій пантотенат г	FeCl ₃ × 6H ₂ O г	Глутамату натрію г
710 мл	0,781	0,568	0,071	1,775	0,0001775	0,00071	0,02272	1,775
6,4 л	7,04	5,12	0,64	16	0,0016	0,0064	0,2048	16

5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (710 мл). Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А - глюкоза (у вигляді розчину; режим стерилізації 112°C протягом 30 хвилин, тиск 0,05 МПа).

Композиція Б – NZ казеїн, рибофлавін, піридоксин, нікотинова кислота, урацил, L-цистин, (112°C, 30 хв. при P=0,05 МПа)

Композиція С – калій дигідрофосфат, кальцій хлорид, магнієвий сульфат гептагідрат, натрій хлорид, тіамін гідрохлорат, кальцій пантотенат, заліза 3 хлорид гексагідрат, глутамату натрію (131°C, 60 хв. при P=0,15 МПа)

Поживне середовище, що використовується для культивування *Clostridium tetani*, а саме NZ казеїн з додаванням рибофлавіну, піридоксину, нікотинової кислоти, урацилу, L-цистину а також розчин глюкози, є термолабільними компонентами і потребують м'якого режиму стерилізації у автоклаві [32] .

Приготування та стерилізація розчину глюкози :

Для першої стадії необхідно приготувати 341 мл середовища. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в табл. 5.4.

Розчин готують у асептичних умовах масо-об'ємним способом. Глюкозу розчиняють приблизно в 2/3 об'єму води для ін'єкцій, додають при перемішуванні натрію хлорид і 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти до рН 3,0-4,1 (4,8-5,2 мл), об'єм розчину доводять водою для ін'єкцій до необхідного обсягу [33]

Приготування та стерилізація середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках:

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 341 мл поживного середовища. Кислий казеїн використовувався як джерело азоту.

Урацил та L-цистин – джерела таких елементів як: водень, карбон, нітроген, кисень та сірка.

Калій дигідрофосфат – джерело калію та фосфору.

Кальцій хлорид, натрій хлорид – джерело хлору, кальцію та натрію.

Магнієвий сульфат гептагідрат – джерело магнію та сульфуру.

Заліза 3 хлорид гексагідрат – джерело феруму ,

Глутамату натрію – джерело натрію, нітрогену.

Вміст компонентів для приготування 710 мл середовища наведені в табл. 5.5

Таблиця 5.5.

Вміст компонентів для для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці (710 мл)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 710 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	8	5,68	А	11,36
Дистильована вода	11,36 мл			
NZ казеїн,	33,3	23,643	Б	419,184
Рибофлавін,	0,00025	0,0001775		
Піридоксин,	0,00025	0,0001775		
Нікотинова кислота,	0,00025	0,0001775		
Урацил	0,00125	0,0008875		
L-цистин	0,125	0,08875		
Дистильована вода	419,184 мл			
K ₂ HPO ₄	1,1	0,781	С	279,456

Закінчення таблиці 5.5

CaCl ₂	0,8	0,568		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1	0,071		
NaCl	2,5	1,775		
Тіаміну гідрохлорат	0,00025	0,0001775		
Кальцій пантотенат	0,001	0,00071		
FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,032	0,02272		
Глутамату натрію	2,5	1,775		
Дистильована вода	279,456 мл			
Всього	710 мл			

Приготування та стерилізація композиції А (розчину глюкози)

Для приготування першої композиції, готуємо розчин у асептичних умовах масо-об'ємним способом. Глюкозу масою 5,68 г розчиняємо приблизно в 2/3 об'єму води для ін'єкцій - 11,36 мл, додаємо при перемішуванні натрію хлориду і 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти до рН 3,0-4,1, об'єм розчину доводимо до необхідного обсягу водою для ін'єкцій.

Закривають ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

Приготування та стерилізація композиції В. (NZ казеїн, рибофлавін, піридоксин, нікотинова кислота, урацил, L-цистин).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: казеїну - 23,643 г, рибофлавіну, піридоксин, нікотинова кислота - 0,0001775 г, урацилу -

0,0008875г, L-цистин - 0,08875 г . Вносимо у колбу на 500 мл, заливають 419,184 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

Приготування та стерилізація композиції С. (калій дигідрофосфат, кальцій хлорид, магнієвий сульфат гептагідрат, натрій хлорид, тіамін гідрохлорат, кальцій пантотенат, заліза 3 хлорид гексагідрат, глутамату натрію).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: калій дигідрофосфату – 0,781 г, кальцій хлориду – 0,568 г, магнієвий сульфат гептагідрату – 0,071 г, натрій хлориду- 1,775 г, тіамін гідрохлорату - 0,0001775 г, кальцій пантотенату - 0,00071 г , заліза 3 хлорид гексагідрату – 0,02272 г та глутамату натрію – 1,775 г. Вносимо у колбу на 500 мл, заливають 279,456 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 131°С, 60 хв, за тиску 0,15 МПа.

Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л :

Готуючи поживне середовище заданого об'єму необхідно врахувати, що додають 10% посівного матеріалу, відповідно, кількість води для приготування поживного середовища буде складати 5,76 л.

Для композиції А кількість води буде становити 92,16 мл , для композиції В – 3,4 л, для композиції С – 2,26784 л

Вміст компонентів для приготування поживного середовища виробничого біосинтезу наведений в табл. 5.6.

Таблиця 5.6.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокулятор об'ємом 10 л (6,4 л – 0,640 л = 5,76 л)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,76 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл, л
Глюкоза	8	46,08	А	92,16 мл
Дистильована вода	92,16 мл			
NZ казеїн,	33,3	191,808	Б	3,4 л
Рибофлавін,	0,00025	0,00144		
Піридоксин,	0,00025	0,00144		
Нікотинова кислота,	0,00025	0,00144		
Урацил	0,00125	0,0072		
L-цистин	0,125	0,72		
Дистильована вода	3,4 л			
K ₂ HPO ₄	1,1	6,336	С	2,26784 л
CaCl ₂	0,8	4,608		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1	0,576		
NaCl	2,5	14,4		
Тіаміну гідрохлорат	0,00025	0,00144		

Закінчення таблиці 5.6

Кальцій пантотенат	0,001	0,00576		
FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,032	0,18432		
Глутамату натрію	2,5	14,4		
Дистильована вода	2,26784 л			
Всього	5,76 л			

Приготування та стерилізація композиції А (розчину глюкози)

Для приготування першої композиції, готуємо розчин у асептичних умовах масо-об'ємним способом. Глюкозу масою 46,08 г розчиняємо приблизно в 2/3 об'єму води для ін'єкцій – 92,16 мл, додаємо при перемішуванні натрію хлориду і 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти до рН 3,0-4,1, об'єм розчину доводимо до необхідного обсягу водою для ін'єкцій.

Закривають ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

Приготування та стерилізація композиції В. (NZ казеїн, рибофлавін, піридоксин, нікотинова кислота, урацил, L-цистин).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: казеїну – 191,808 г, рибофлавіну, піридоксин, нікотинова кислота – 0,00144 г, урацилу - 0,0072 г, L-цистин – 0,72 г . Вносимо в кобу на 5 л, заливають 3,4 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

Приготування та стерилізація композиції С. (калій дигідрофосфат, кальцій хлорид, магнієвий сульфат гептагідрат, натрій хлорид, тіамін гідрохлорат, кальцій пантотенат, заліза 3 хлорид гексагідрат, глутамату натрію).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: калій дигідрофосфату – 6,336 г, кальцій хлориду – 4,608 г, магнієвий сульфат гептагідрату – 0,576 г, натрій хлориду- 14,4 г, тіамін гідрохлорату – 0,00144 г, кальцій пантотенату – 0,00576 г, заліза 3 хлорид гексагідрату – 0,18432 г та глутамату натрію – 14,4 г. Вносимо у колбу на 3 л, заливають 2,26784 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 131°C, 60 хв, за тиску 0,15 МПа.

Приготовані композиції А, В та С поміщають у спеціальний ферментер на 10 л.

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для стабілізації рН

Для підтримання необхідного рівня кислотності(7,4-7,6) під час культивування ми будемо застосовувати такі розчини : 6%-ий розчин хлоридної кислоти та 40%-ий розчин гідроксиду амонію (титрувальний розчин).

Розчин 6%-ий хлоридної кислоти має властивість ефективно знижувати рівень рН у середовищі, що робить його корисним для регулювання кислотності. З іншого боку, 40%-ий розчин гідроксиду амонію є сильною луговою речовиною та може бути використаний для підняття рівня рН. Об'єднуючи ці два розчини, можна точно контролювати та підтримувати бажаний рівень кислотності в системі, забезпечуючи оптимальні умови для багатьох хімічних процесів та біологічних процесів.

Приготування розчинів для титрування:

Приготування 6%-го розчину HCl:

Соляна кислота (HCl) використовується для регулювання рівня рН у ферментері, попередження реакцій залуження. У ферментер додають 6% розчин HCl з розрахунком 0,002 л на 1 л середовища. В нас максимальний об'єм середовища = 6,4 л. Отже, в нас виходить наступне співвідношення потрібна кількість HCl:

$$6,4 \times 0,002 = 0,0128 \text{ л} = 12,8 \text{ мл (р-ну HCl)}$$

Для приготування 12,8 мл 6% р-ну HCl нам потрібно буде використати 1 колба об'ємом 20 мл. У колбі треба змішати :

- 2 мл 38% соляної кислоти
- 10,8 мл дистильованої води.

Сама соляна кислота має властивість знищувати багато мікроорганізмів, включаючи бактерії та гриби, завдяки своєму низькому рН та властивостям денатурації білків. Тому розчин можна не стерилізувати.

Приготування та стерилізація 40%-го розчину гідроксиду амонію:

Аміак є слабкою основою і може використовуватися для підвищення рН культурної суміші в ферментері. Регулювання рН є важливим чинником для оптимального росту і активності мікроорганізмів у ферментері. Тому ми для підтримання оптимального рН на рівні 7,4-7,6 додаємо 40% розчину гідроксиду амонію.

Під час роботи з розчинами гідроксиду амонію повинні вживатися відповідні заходи безпеки та контролю, оскільки аміак може бути отруйним і небезпечним для здоров'я людини при некоректному використанні.

У ферментер додають 40% розчин NH_4OH з розрахунком 0,002 л на 1 л середовища. В нас максимальний об'єм середовища = 6,4 л. Отже в нас виходить наступне співвідношення потрібна кількість NH_4OH :

$$6,4 \times 0,002 = 0,0128 \text{ л} = 12,8 \text{ мл (р-ну } \text{NH}_4\text{OH)}$$

Отже, 12,8 мл 40% NH_4OH вносять у колбу на 20 мл, фільтрують через мембранний фільтр так, щоб фільтрат опинявся у стерильній колби. Зберігають у ній же.

Виміряємо потрібну кількість концентрованого розчину аміаку (NH_4OH). Щоб приготувати 12,8 мл 40% розчину NH_4OH , нам потрібно 5,12 мл концентрованого розчину (оскільки 40% від 12,8 мл - це 5,12 мл розчину NH_4OH).

Додаємо дистильовану воду до потрібного об'єму, який у цьому випадку становить 7,68 мл (оскільки 12,8 мл - це 5,12 мл концентрованого розчину NH_4OH і 7,68 мл води).

Після того, як обидва компоненти добре перемішалися, отриманий розчин буде містити близько 40% аміаку.

Отриманий розчин можна зберігати у тій самій колбі.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Таблиця 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
БФ1	Биореактор/ферментер	2	Биореактор/ферментер New Brunswick BioFlo310, до 10 л [34],
ПН 2	Перистальтичний насос , 15 л/год	1	Перистальтичний насос SEKO серії LR, 15 л/год, 0,1 бар, SEKOFLEX [35].
МФ 3	Мембранні фільтри	3	МАНКОР : Мембранні фільтри з поліетилсульфону (PES) [37].
НД 4	Насос дозуючий	1	Насос дозуючий цифровий Seko pH/Rx TPR803 Tekna EVO 20-110 л/год - 2 BAR [36].

НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ				
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Соколова О.А.		
Перевір.		Пенчук Ю.М.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання				
		Літ.	Арк.	Аркуші
			65	99
Кафедра БТМ				66

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

Технологічний процес біосинтезу тетаноспазміну *Clostridium tetani* штам Копенгаген 471 складається із допоміжних і основних робіт. До стадій допоміжних робіт (ДР) належить: приготування розчину HCl та NH₄OH, підготовка і стерилізація поживного середовища. До основного технологічного процесу (ТП) відносять стадії приготування посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

ДР 1. Приготування розчинів для титрування

ДР 1.1. Приготування 6%-го розчину HCl:

Соляна кислота (HCl) використовується для регулювання рівня рН у ферментері, попередження реакцій залуження. У ферментер додають 6% розчин HCl з розрахунком 0,002 л на 1 л середовища. В нас максимальний об'єм середовища = 6,4 л. Отже, в нас виходить наступне співвідношення потрібна кількість HCl:

$$6,4 \times 0,002 = 0,0128 \text{ л} = 12,8 \text{ мл (р-ну HCl)}$$

Для приготування 12,8 мл 6% р-ну HCl нам потрібно буде використати 1 колба об'ємом 20 мл. У колбі треба змішати :

- 2 мл 38% соляної кислоти
- 10,8 мл дистильованої води.

Сама соляна кислота має властивість знищувати багато мікроорганізмів, включаючи бактерії та гриби, завдяки своєму низькому рН та властивостям денатурації білків. Тому розчин можна не стерилізувати.

Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ			
Розроб.		Соколова О.А.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					66	99
Реценз.						Кафедра БТМ 67		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР. 1. 2 Приготування та стерилізація 40%-го розчину гідроксиду амонію:

Аміак є слабкою основою і може використовуватися для підвищення рН культурної суміші в ферментері. Регулювання рН є важливим чинником для оптимального росту і активності мікроорганізмів у ферментері. Тому ми для підтримання оптимального рН на рівні 7,4-7,6 додаємо 40% розчину гідроксиду амонію.

Під час роботи з розчинами гідроксиду амонію повинні вживатися відповідні заходи безпеки та контролю, оскільки аміак може бути отруйним і небезпечним для здоров'я людини при некоректному використанні.

У ферментер додають 40% розчин NH_4OH з розрахунком 0,002 л на 1 л середовища. В нас максимальний об'єм середовища = 6,4 л. Отже в нас виходить наступне співвідношення потрібна кількість NH_4OH :

$$6,4 \times 0,002 = 0,0128 \text{ л} = 12,8 \text{ мл (р-ну } \text{NH}_4\text{OH)}$$

Отже, 12,8 мл 40% NH_4OH вносять у колбу на 20 мл, фільтрують через мембранний фільтр так, щоб фільтрат опинявся у стерильній колби. Зберігають у ній же.

Виміряємо потрібну кількість концентрованого розчину аміаку (NH_4OH). Щоб приготувати 12,8 мл 40% розчину NH_4OH , нам потрібно 5,12 мл концентрованого розчину (оскільки 40% від 12,8 мл - це 5,12 мл розчину NH_4OH).

Додаємо дистильовану воду до потрібного об'єму, який у цьому випадку становить 7,68 мл (оскільки 12,8 мл - це 5,12 мл концентрованого розчину NH_4OH і 7,68 мл води).

Після того, як обидва компоненти добре перемішалися, отриманий розчин буде містити близько 40% аміаку.

Отриманий розчин можна зберігати у тій самій колбі.

ДР 2. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР.2.1 Приготування та стерилізація середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках:

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 710 мл поживного середовища. Кислий казеїн використовувався як джерело азоту.

Урацил та L-цистин – джерела таких елементів як: водень, карбон, нітроген, кисень та сірка.

Калій дигідрофосфат – джерело калію та фосфору.

Кальцій хлорид, натрій хлорид – джерело хлору, кальцію та натрію.

Магнієвий сульфат гептагідрат – джерело магнію та сульфуру.

Заліза 3 хлорид гексагідрат – джерело феруму ,

Глутамату натрію – джерело натрію, нітрогену.

ДР. 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А (розчину глюкози)

Для приготування першої композиції, готуємо розчин у асептичних умовах масо-об'ємним способом. Глюкозу масою 5,68 г розчиняємо приблизно в 2/3 об'єму води для ін'єкцій - 11,36 мл, додаємо при перемішуванні натрію хлориду і 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти до рН 3,0-4,1, об'єм розчину доводимо до необхідного обсягу водою для ін'єкцій.

Закривають ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

ДР. 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції В. (NZ казеїн, рибофлавін, піридоксин, нікотинова кислота, урацил, L-цистин).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: казеїну - 23,643 г, рибофлавіну, піридоксин, нікотинова кислота - 0,0001775 г, урацилу - 0,0008875г, L-цистин - 0,08875 г . Вносимо у колбу на 500 мл, заливають 419,184 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

ДР. 2.1.3 Приготування та стерилізація композиції С. (калій дигідрофосфат, кальцій хлорид, магнієвий сульфат гептагідрат, натрій хлорид, тіамін гідрохлорат, кальцій пантотенат, заліза 3 хлорид гексагідрат, глутамату натрію).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: калій дигідрофосфату – 0,781 г, кальцій хлориду – 0,568 г, магнієвий сульфат гептагідрату – 0,071 г, натрій хлориду- 1,775 г, тіамін гідрохлорату - 0,0001775 г, кальцій пантотенату - 0,00071 г , заліза 3 хлорид гексагідрату – 0,02272 г та глутамату натрію – 1,775 г. Вносимо у колбу на 500 мл, заливають 279,456 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 131°С, 60 хв, за тиску 0,15 МПа

ДР. 3 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л :

Готуючи поживне середовище заданого об'єму необхідно врахувати, що додають 10% посівного матеріалу, відповідно, кількість води для приготування поживного середовища буде складати 5,76 л.

Для композиції А кількість води буде становити 92,16 мл , для композиції В – 3,4 л, для композиції С – 2,26784 л

Вміст компонентів для приготування поживного середовища виробничого біосинтезу наведений в табл. 2.5.

ДР.3.1 Приготування та стерилізація композиції А (розчину глюкози)

Для приготування першої композиції, готуємо розчин у асептичних умовах масо-об'ємним способом. Глюкозу масою 46,08 г розчиняємо приблизно в 2/3 об'єму води для ін'єкцій – 92,16 мл, додаємо при перемішуванні натрію хлориду і 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти до рН 3,0-4,1, об'єм розчину доводимо до необхідного обсягу водою для ін'єкцій.

Закривають ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

ДР.3.2 Приготування та стерилізація композиції В. (NZ казеїн, рибофлавін, піридоксин, нікотинова кислота, урацил, L-цистин).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: казеїну – 191,808 г, рибофлавіну, піридоксин, нікотинова кислота – 0,00144 г, урацилу - 0,0072 г, L-цистин – 0,72 г . Вносимо в кобу на 5 л, заливають 3,4 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа.

ДР.3.3 Приготування та стерилізація композиції С. (калій дигідрофосфат, кальцій хлорид, магнієвий сульфат гептагідрат, натрій хлорид, тіамін гідрохлорат, кальцій пантотенат, заліза 3 хлорид гексагідрат, глутамату натрію).

Для приготування другої композиції, ми на технічних вагах зважуємо: калій дигідрофосфату – 6,336 г, кальцій хлориду – 4,608 г, магнієвий сульфат гептагідрату – 0,576 г, натрій хлориду- 14,4 г, тіамін гідрохлорату – 0,00144 г, кальцій пантотенату – 0,00576 г, заліза 3 хлорид гексагідрату – 0,18432 г та глутамату натрію – 14,4 г. Вносимо у колбу на 3 л, заливають 2,26784 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 131°C, 60 хв, за тиску 0,15 МПа.

Приготовані композиції А, В та С поміщають у спеціальний ферментер на 10 л.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Clostridium tetani Massachusetts's* зберігають у ліофілізованому стані (осушення холодом з виморожуванням. Являє собою процес дегідратації для збереження оригінальних властивостей продукту) при 4-8 °С.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих поживних середовищах на чашка Петрі

Культуру клітин висівають штрихом на чашку Петрі із цукрово-кров'яном агаром до ізольованих колоній. Вирощують без доступу кисню в анаеростаті при температурі від 33 до 37°C, протягом 24-28 год.

ТП 4.3. Вирощування культури у рідкому поживному середовищі у пробірках

Підготовуємо середовище Кітта-Тароцці. Переносимо оточуюче середовище у анаеробну камеру або систему, оскільки *Clostridium tetani* є анаеробами і не росте в присутності кисню.

В асептичних умовах пересівємо петлею в пробірки із середовищем Кітта-Тароцци, у розрахунку одна ізольована колонія для засіву однієї пробірки.

Вирощуємо упродовж 24 годин в анаеростаті, який поміщений в термостат за температури 34 °С.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбах на качалках приготовлені та простерилізовані композиції А,В та С асептично вносять у стерильну колбу на 1 л . В пробірку з робочою культурою *Clostridium tetani* (ТП 5.1) додають 710 мл дистильованої води та суспендують клітини, відбирають за допомогою піпетки одержану суспензію та вносять її у стерилізовану качалочну колбу з поживним середовищем. Анаеробні умови у колбі забезпечуються великим коефіцієнтом заповнення. Культивують при $t = 34\text{ }^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів 150 об/хв. 24 години.

ТП . 5 Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

У одноразову ємкість ферментера вносять простерилізовані композиції А, В та С. рН середовища доводять до значення 7,4-7,6 за допомогою титрувальних розчинів (від ДР 1.1, ДР 1.2). Стерильно вносять інокулят.

Виробничий біосинтез триває 82 год при температурі 35 оС, рН 7,4-7,6, при постійній подачі інертного газу.

По закінченню часу біосинтезу культуральна рідина поступає на стадію одержання анатоксину.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

8.1. Мікробіологічний контроль

Морфологічні ознак клітини, що спостерігаються під час мікроскопіювання.

Clostridium tetani — велика (3-12 × 0,3-0,6 мікрон), рухома за допомогою кількох джгутиків (перитрих) паличкоподібна бактерія. Є частиною роду облигатно-анаеробних, сапрофітних, грампозитивних організмів.

Утворює овальні ендоспори, що перевищують діаметр клітини в 2-3 рази, розташовані термінально (характерна морфологія типу «барабаних паличок») [1].

Під впливом різних умов *C. tetani* може скинути джгутики і утворити спору. Кожна клітина може утворювати одну спору, як правило, на одному кінці клітини, надаючи клітині характерну форму барабанної палички. Спори *C. tetani* надзвичайно витривалі і стійкі до нагрівання, різних антисептиків і кип'ятіння протягом кількох хвилин [1].

Під час процесу культивування мікробіологічний контроль повинен проводитися систематично для виявлення будь-яких контамінантів або забруднень. Це включає в себе розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням. Та періодичні мікробіологічні аналізи проб з культурної середовища, а також моніторинг температури та інших параметрів, які можуть впливати на ріст мікроорганізмів.

Щоб уникнути забруднення культури, повинні використовуватися антисептичні заходи під час роботи з мікроорганізмами. Крім того, контроль рівня кисню у середовищі також може бути важливим, оскільки *Clostridium tetani* є анаеробами.

НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ

Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Соколова О.А.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушіє
Перевір.		Пенчук Ю.М.					73	99
Реценз.						Кафедра БТМ 74		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Культуральну рідину розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) - для виявлення дріжджів і грибів.

Специфіка роботи з правцевим токсином полягає в небезпечності цього



Рис 8.1 Бокс біологічної безпеки (ламiнарна шафа) HR40-IB2 [39].

процесу, тому працювати слід за допомогою ламiнарного бокса.

Ламiнарний бокс (також відомий як ламiнарний потiк або ламiнарний стiл) - це спеціалізований пристрій, що використовується в мікробіології, біохімії, медичинському та фармацевтичному виробництві для стерильної обробки чутливих наукових зразків, матеріалів або продуктів. Його основна функція полягає в забезпеченні чистого середовища з контрольованим напрямком потоку повітря для запобігання забрудненням [39].

Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля».

Кладемо невелику кількість вашого препарату на об'єктне скло. Наносимо невелику кількість води на ваш препарат. Обережно накриваємо скельцем, щоб утворити "роздавлену краплю".

Розміщаємо препарат під мікроскопом і вивчайте його під об'єктивом 40х, а також мікроскопуємо препарат з імерсійною системою.

8.2 Контроль показників росту та синтезу

8.2.1 Визначення біомаси *Clostridium tetani*

Біомасу визначають за оптичною густиною культуральної рідини з наступним перерахунком на абсолютно суху масу за калібрувальним графіком. Для визначення біомаси *Clostridium tetani* за оптичною густиною клітинної суспензії можна використовувати методи спектрофотометрії.

Спектрофотометрія, метод дослідження та аналізу речовин, заснований на вимірі спектрів поглинання в оптичній галузі електромагнітного випромінювання.

Пробу культуральної рідини перемішати, піпеткою внести у кювету об'ємом 5 мл та виміряти оптичну густина на спектрофотометрі за довжини хвилі 660 нм [40].

Для вимірювання використовується спектрофотометр «GK Turner» з фільтром 330-008, 400-680 нм.

Для визначення концентрації розчинів спектрофотометричним шляхом використовується закон Бугера-Ламберта Бера. Визначення, пов'язані з вимірюванням поглинання електромагнітного випромінювання, засновані на

$$A = kcl,$$

об'єднаному законі який має вигляд:

де A - оптична густина речовини; c - концентрація розчину; l - товщина шару речовини, см; k - показник поглинання розчину. Величина k є специфічною фізичною константою для кожної речовини і може бути використана для цілей ідентифікації.

Знання величини дозволяє визначити вміст даної речовини в розчинах невідомої концентрації на основі вимірювання оптичної густини А [41].

8.2.2 Визначення концентрації тетаноспазмину

Визначення концентрації тетаноспазмину, який є токсином, виділеним *Clostridium tetani*, може бути важливим для досліджень з медицини та мікробіології. Для визначення концентрації правцевого токсину застосовують метод флокуляції по Рамону.

Реакція флокуляції (за Рамоном) - це поява подібних пластівців мас (імунопреципітації) у пробірці при реакції токсин - антитоксин або анатоксин - антитоксин. Явище флокуляції, як правило, встановлюється у всіх пробах, але першим це відбудеться у пробі, в якій компоненти нейтралізують один одного, тобто містяться в рівній кількості [42].

Процес флокуляції включає в себе додавання реагенту, який сприяє згущенню частинок токсину у великі агломерати, які можна легко видалити фільтрацією або осіданням [43].

Принцип методу: до серійних розведень антитоксичної сироватки додають однакову кількість антигенних одиниць токсину.

Позитивний результат – утворення пластівців преципітату (флокулята); негативний результат – прозора рідина.

Застосування: визначення активності антитоксичної сироватки (кількості МЕ – міжнародних одиниць в 1 мл суспензії).

Трактування результатів: первинна (ініційна) флокуляція настає у пробірці, де АГ (антиген) та АТ (антитіло) знаходяться в еквівалентних кількостях. Знаючи

кількості інгредієнтів у пробірці, де відбулася ініціальна флокуляція, можна розрахувати активність антитоксичної сироватки.

Наприклад, ініціальна флокуляція настала у пробірці, де знаходиться 0,02 мл сироватки та 4 АЕ (антигенних одиниць) токсину або анатоксину. Складаємо пропорцію: 0,02 мл сироватки еквівалентно 4 АЕ токсину або анатоксину.

Одна АЕ - це така кількість токсину або анатоксину, яка зв'язується однією МЕ антитоксичної сироватки, отже, 0,02 мл цієї сироватки містить 4 МЕ.

Титр антитоксичної сироватки – це кількість МЕ в 1 мл цієї сироватки.

В даному випадку, склавши пропорцію, можна визначити титр:

$$0,02 \text{ мл} - 4 \text{ МЕ}$$

$$1 \text{ мл} - X \text{ МЕ}$$

$$X = (1 \times 4) : 0,02 = 200 \text{ МЕ} [44].$$

Особливістю визначення тетанотоксину є те, що важливо мінімізувати час, витрачений на приготування сумішей, оскільки в іншому випадку можливі неоднозначні результати. Крім того, отримані висновки сильно залежать від походження антитоксину та токсину, а також від їхньої чистоти. При виготовленні анатоксину він часто забруднений формаліновими аддуктами тваринних білків або продукти їх часткового розпаду. Індикатором успішного визначення є той факт, що у деяких пробах флокуляція спостерігається лише в одній точці еквівалентності, що свідчить про високу якість та правильний вибір параметрів [42], [44].

Алгоритм проведення:

Збираючи культуральну рідину, беруть пробу об'ємом 12 мл, яку переносять у центрифужну пробірку об'ємом 15 мл. Цю пробірку піддають центрифугуванню

протягом 30 хвилин при швидкості 3400 обертів за хвилину та при температурі 4 °С. В пробірки, які містять від 0,1 до 0,6 мл стандартного правцевого антитоксину, додають аліквоти супернатанту об'ємом 1 мл кожна. Пробірки ретельно перемішують для забезпечення однорідності і поміщають на водяну баню при температурі 45 °С, фіксуючи час. Протягом цього процесу постійно відслідковують та реєструють час початку флокуляції [43] .

8.2.3 Визначення вмісту амінного азоту йодометричним методом (мідним методом)

Визначення концентрації амінного азоту мідним методом важливе для вивчення культур бактерій, таких як *Clostridium tetani*. Мідний метод визначення амінного азоту використовує реакцію між амінным азотом і реагентом, що містить мідь, з наступною колориметричною або спектрофотометричною оцінкою зміни кольору реакції [45].

Прилади, посуд і реактиви: мірні колби місткістю 50 і 100 мл, піпетки місткістю 5 і 10 мл, мірний циліндр місткістю 50 мл, конічна колба місткістю 100 мл, мікробюретка місткістю 2 мл, розчин хлориду міді (27,3 г солі розчиняють в 1 л води); розчин фосфату натрію; боратний буферний розчин (57,21 г бури розчиняють в 1,5 л води, додають 100 мл розчину соляної кислоти концентрацією 1 моль/л і доводять водою до 2 л); суспензія фосфату міді; розчин тимолфталейну (0,25 г індикатору в 100 мл 50%-го спирту); розчин тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л; 1 %-й розчин крохмалю; 80 %-на або крижана оцтова кислота; розчин гідроксиду натрію концентрацією 1 моль/л; 10 %-й розчин йодиду калію.

Техніка аналізу: вмірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 мл дослідного розчину, додають 3-4 краплини індикатору тимолфталейну і по краплям

розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/л до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 мл 80%-ї оцтової кислоти і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, що пішла на титрування, на 0,28. Це відповідає з урахуванням розчинення 1 мл дослідного розчину. Вміст амінного азоту розраховують за рівнянням:

$$x = a \times 0,28 \times b \times 10 \times 100 \div 50 \text{ (мл в 100 мл клітинної суспензії)}.$$

де а – розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, який пішов на титрування;

б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз [46].

8.2.4 Визначення вмісту вуглеводів методом Шорля

Метод Шорля є хімічним аналітичним методом, який використовується для кількісного визначення цукрів та інших вуглеводів у різних зразках, включаючи біологічні зразки, такі як культури мікроорганізмів, включаючи *Clostridium tetani*.

Прискорений йодометричний метод визначення масової частки цукру (метод Шорля) відрізняється простотою, високою точністю визначення і можливістю визначення вмісту цукру в досить широких межах концентрації (від 0,3 до 88,2 мг в 30 см³ розчину).

Техніка визначення:

В конічну колбу на 200...300 см³ вносять піпеткою 30 мл досліджуваного розчину і додають піпеткою бо з бюретки 10 мл 7 %-ного розчину купрум(II)сульфату і 10 мл лужного розчину сегнетової солі (калій-натрій тартрат), доводять суміш протягом 2 хв. до кипіння, кип'ять рівно 2 хв, швидко охолоджують до кімнатної температури, додають 3 г калій йодиду, розчиненого в 10 мл дистильованої води, 10 мл 25%-ної сірчаної кислоти і відразу титрують 0,1 н розчином тіосульфату натрію до світло-жовтого забарвлення. Потім додають 2 мл індикатору (1%-ний розчин крохмалю) і продовжують титрувати до зникнення синього забарвлення. Аналогічно проводять контрольний дослід, в якому замість 30 мл досліджуваного розчину беруть таку ж кількість дистильованої води. Різницю між об'ємом витраченого на титрування Na₂S₂O₃ в контрольному досліді і об'ємом в досліді з витяжкою цукру, множать на поправку до титру розчину тіосульфату натрію. За даною величиною визначають еквівалентну кількість Na₂S₂O₃, яка дорівнює еквівалентній кількості відновлених Cu²⁺-іонів [38].

8.4. Показники якості готового продукту

Токсин, що виявляється в культурі *Clostridium tetani* під дією формальдегіду перетворюється на а нетоксичний, але все ж імуногенний правцевий анатоксин. Класичний вакцина виробляється в кілька етапів: культивування *Clostridium tetani* та освітлення токсиновмісного середовища з наступним концентруванням та

інактивацією токсину, очищення анатоксину шляхом діяфільтрації та адсорбції на солі алюмінію.

Середовище та умови культивування росту важливі отримання високого виходу токсину, а також у забезпеченні того, що подальша обробка токсину призводить до виробництва а безпечна вакцина високої імуногенності. Оптимізація аерації, час інкубації та температура для стерилізації тощо невеликі фактори, які відповідають за виробництво безпечних і сильнодіючий правцевий анатоксин.

Якість правцевого анатоксину залежить, в основному, від процесу детоксикації, в реакції важливі такі умови, як концентрація формальдегіду та час реакції і температура [47].

Оптимальна концентрація формальдегіду необхідна для забезпечення повної інактивації токсину без порушення його антигенних властивостей. Надмірна концентрація може призвести до надмірної модифікації білка, що знизить його імуногенність, а недостатня – залишить активні токсичні фрагменти.

Тривалість детоксикації повинна бути ретельно контрольована. Надто короткий час може не забезпечити повної інактивації токсину, тоді як занадто довгий може призвести до руйнування антигенних детермінант, що знизить ефективність анатоксину як вакцини.

Температура реакції має бути оптимальною для підтримання стабільності білкової структури тетаноспазмину під час детоксикації. Занадто висока температура може спричинити денатурацію білка, а надто низька – зменшити швидкість реакції з формальдегідом.

РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва

Технології отримання правцевого токсину передбачають:

Доферментаційні допоміжні роботи, які охоплюють кілька ключових підпроцесів, включаючи підготовку азоту, санітарну підготовку виробничих приміщень, а також приготування і стерилізацію титрувальних агентів і поживного середовища. Ці підпроцеси критично важливі для забезпечення стерильних умов і наявності необхідних хімічних компонентів для наступних етапів отримання посівного матеріалу та здійснення виробничого біосинтезу. А також формують певні категорії виробничих відходів.

Підготовка азоту передбачає його очищення і зберігання, що забезпечує необхідний рівень чистоти для використання у процесі ферментації, та потребує його подальшого очищення та утилізації. Санітарна підготовка виробництва включає ретельну дезінфекцію обладнання та приміщень, що знижує ризик контамінації і забезпечує безпеку виробничого процесу, створюючи певну кількість відпрацьованих мийних засобів.

Додатково, приготування титрувальних агентів та поживного середовища включає точне дозування компонентів та їх подальшу стерилізацію. Слід зазначити, що всі компоненти поживного середовища для вирощування бактерії *S.tetani* проходять стерилізацію, але з метою збереження поживних речовин у максимально придатному для споживання стані, процес стерилізації умовно поділяємо на композиції.

					НУХТ БТЕК 04.02.53 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Соколова О.А.					82	99
Перевір.		Пенчук Ю.М.				Кафедра БТМ 83		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Технологічний процес біосинтезу тетаноспазміну бактерією *Clostridium tetani* включає в себе культивування бактерій, умови специфічного середовища, виробництво токсину, його виділення та очищення, а також перевірку та зберігання готового продукту.

Біотехнологічні підприємства генерують три основні категорії відходів:

Виробничі відходи

Виробничі відходи є найбільш різноманітними і включають в себе біологічні, хімічні та технологічні залишки. Біологічні відходи можуть включати клітинні культури, відпрацьовані мікроорганізми та інші біологічні матеріали, які використовуються або створюються під час біотехнологічних процесів. Хімічні відходи включають залишки реактивів, токсичні речовини та інші хімічні компоненти, які можуть бути шкідливими для навколишнього середовища.

Побутові відходи

Побутові відходи утворюються в результаті повсякденної діяльності працівників біотехнологічних підприємств. До цієї категорії відходів відносяться залишки їжі, упаковка, папір, пластик та інші матеріали, що використовуються в офісах та інших приміщеннях підприємства. Хоча ці відходи не є такими небезпечними, як виробничі, їх утилізація та переробка є важливими для забезпечення екологічної сталості.

Атмосферні відходи

Атмосферні відходи включають викиди в повітря, які утворюються в процесі виробничої діяльності біотехнологічних підприємств. Ці викиди можуть містити різноманітні гази, пари та аерозолі, деякі з яких можуть бути шкідливими для навколишнього середовища та здоров'я людини.

9.1 Системи знешкодження рідких відходів

На території промислових підприємств утворюються три категорії стічних вод: виробничі, побутові й атмосферні.

У процесі виробництва утворюються залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Для очищення та дезінфекції обладнання використовуються мобільні циркуляційні СІР-мийки. Для цих мийок готуються робочі розчини об'ємом 20-30% від загальної ємності обладнання, включаючи реактори-збірники, інокулятори та ферментери.

Дотримання рекомендацій щодо концентрації засобів забезпечує ефективне очищення. Контроль якості розчинів та перевірка стану обладнання мінімізують залишкові засоби та забезпечують санітарну безпеку. Використання автоматизованих систем дозування підвищує ефективність миття та зменшує витрати.

$$V_{\text{ємностей}} = V(\text{реактор}) + V(\text{ферментер}) + V(\text{колби}) = 10 + 10 + 1 = 21 \text{ л}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = 21 \times 0,2 = 4,2 \text{ л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 21 \times 0,3 = 6,3 \text{ л}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 4,2 – 6,3.

В сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме:
 $6,3 + 6,3 = 12,6 \text{ л}$.

Орієнтовний об'єм стічних вод на повний об'єм ферментеру в 10 л, становить 12,6 л.

Відповідно до розрахунків за один цикл отримуємо 6,45 л культуральної рідини, з концентрацією кінцевого продукту 0,1 % від біомаси, (0,00645 г).

Так як основна частина культуральної рідини є вода, то $6,45 - 0,00645 = 6,44355$ л. Для зручності обрахунків округлюємо до 6,44 л.

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 0,00645 г/л кінцевого продукту та 6,44 л води.

Оскільки цикл триває 82 години за 1 добу отримаємо $6,44/3,416 = 1,88$ л.

9. 1. 1 Визначаємо середні витрати стічних вод від виробничого підприємства

Приймаємо кількість трудоднів – 75, тоді об'єм культуральної рідини за добу буде вираховуватися по формулі і становитиме:

$$86 / 75 = 1,14 \text{ л}$$

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод, м³/добу, визначають за формулою:

$$Q_e = q_e \cdot n$$

Де q_e - норма водовідведення в м³ на одиницю продукції, яку випускає підприємство (орієнтовно можна прийняти відповідно до пройденої практики тобто 50-100 л); n – кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу) .

$$50 \times 1,14 = 57 \text{ л/доба.}$$

Тоді, середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху 0,025 м³/зм); N – кількість робітників, що працюють у зміну.

Для ефективної організації виробничого процесу під час однієї зміни ми приймаємо, що кількість робітників складатиме 7 осіб. Серед них:

1. Керівник зміни:

Керує роботою всієї команди на зміні, координує дії працівників, забезпечуючи ефективне виконання виробничого плану.

Відповідає за дотримання графіків, контроль виконання завдань та звітність перед вищим керівництвом.

2. Технолог цеху (біотехнолог)

Відповідає за весь процес культивування біомаси, включаючи підготовку ферментера, проведення культивування, збір і очищення отриманої біомаси.

3. Мікробіолог з контролю якості (ВКЯ)

Відповідає за контроль якості на всіх етапах виробничого процесу, зокрема під час культивування, збору та очищення біомаси.

Виконує необхідні мікробіологічні тестування і забезпечує належну документацію результатів.

4. Технік з обслуговування та ремонту обладнання:

Відповідає за технічне обслуговування та своєчасний ремонт виробничого обладнання, щоб уникнути простоїв і забезпечити безперервність виробничого процесу.

5. Санітарний працівник:

Забезпечує підтримання високих стандартів санітарної гігієни та чистоти в цеху.

Проводить підготовку приміщень, дезінфекцію обладнання та поверхонь.

6. Оператор виробничого обладнання:

Відповідає за роботу і контроль виробничого обладнання, зокрема ферментерів та інших систем, що використовуються у процесі культивування.

Проводить налаштування, запуск та моніторинг обладнання, забезпечуючи стабільний і ефективний виробничий процес.

7. Лаборант (асистент мікробіолога)

Допомагає мікробіологу з контролю якості у виконанні тестів та аналізів.

Проводить підготовку зразків, підтримує порядок у лабораторії та забезпечує наявність необхідних реактивів і матеріалів.

$$25 \times 7 = 175 \text{ л/зміну}$$

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = Q_{n1} \cdot N_{зм}$$

$$175 \cdot 3,416 = 598 \text{ л/добу,}$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу ($N_{зм} = 3,416$).

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a$$

$$57 + 598 + 1,88 \text{ л} = 657 \text{ л/добу.}$$

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

Оскільки облигатно-анаеробні організми не здатні рости під впливом кисню, нема необхідності при біотехнологічних процесах проводити аерацію в посівному апараті. Для створення анаеробних умов під час виробничого біосинтезу забезпечують подачу азоту у біореактор. В такому випадку передбачаємо знешкодження азоту.

З анаеростатів відкачують повітря, а потім заповнюють сумішшю азоту (80-90%) та вуглекислого газу (10-20%), за рахунок якої створюється надлишковий тиск, який перешкоджає проникненню кисню з повітря [50].

Фільтр для фільтрування повітря або газів під час культивування *Clostridium tetani* повинен мати мінімальний розмір пор, щоб уникнути контамінації культури і забезпечити оптимальні умови для росту мікроорганізмів. Оскільки *Clostridium tetani* є анаеробним бактеріальним видом, важливо, щоб фільтр був здатний утримувати аеробні мікроорганізми та допомагав утримувати анаеробні умови в середовищі культивування.

Очищення та утилізація відпрацьованого азоту після культивування є критичними процесами для біотехнологічних підприємств, оскільки азотовмісні сполуки можуть значно забруднювати навколишнє середовище.

Методи очищення відпрацьованого азоту:

Хімічна нейтралізація, де азот перетворюється на менш шкідливі форми, такі як амонійні солі, за допомогою кислот, знижує токсичність відходів.

Фізичні методи, такі як абсорбція та мембранні технології, також застосовуються для видалення азоту з рідких відходів. Мембранні фільтри ефективно відокремлюють азотовмісні сполуки, забезпечуючи чистоту вихідного потоку. Комбінація цих методів дозволяє досягти високого рівня очищення.

Утилізація відпрацьованого азоту

Утилізація відпрацьованого азоту здійснюється різними способами. Один із найпоширеніших методів – переробка азотовмісних сполук у добрива, які використовуються в сільському господарстві. Це зменшує залежність від синтетичних добрив і сприяє замкнутому циклу використання ресурсів.

Таким чином, очищення та утилізація відпрацьованого азоту після культивування є важливими складовими екологічного менеджменту на біотехнологічних підприємствах, допомагаючи мінімізувати екологічний вплив і забезпечити сталий розвиток галузі [51].

9.3. Системи знешкодження твердих відходів

Системи знешкодження твердих відходів при промисловому виробництві правцевого анатоксину відіграють ключову роль у забезпеченні безпеки та екологічної відповідальності підприємства. Виробництво правцевого анатоксину супроводжується утворенням значної кількості твердих відходів, включаючи залишки біологічних матеріалів, лабораторне обладнання, контаміновані інструменти та інші відходи, що можуть становити біологічну небезпеку. Для ефективного управління цими відходами впроваджуються комплексні системи, які включають декілька ключових етапів.

На першому етапі відходи сортуються за типами та рівнем небезпеки. Біологічно небезпечні відходи, такі як залишки культур правцевого токсину, відокремлюються від менш небезпечних відходів. Потім проводиться попередня обробка, яка включає дезінфекцію та стерилізацію для зниження ризику зараження. Одним із найважливіших етапів обробки є стерилізація, що забезпечується за допомогою автоклавів або хімічних дезінфектантів, таких як гіпохлорит натрію (гіпохлорит натрію, також відомий як хлорат натрію (I) або

натрієва сіль хлорноватистої кислоти, є неорганічною хімічною сполукою, яку отримують шляхом насичення хлору водним розчином гідроксиду натрію. Ця сполука у вільному стані дуже нестабільна, зазвичай використовується у вигляді водного розчину.) або перекис водню [51].

Утилізація стерилізованих твердих відходів здійснюється відповідно до екологічних норм і вимог, часто через спеціалізовані полігони для захоронення небезпечних відходів або спалювальні установки.

Таким чином, системи знешкодження твердих відходів при виробництві правцевого анатоксину повинні бути комплексними та ефективними, включаючи сортування, стерилізацію, подрібнення, утилізацію та постійний моніторинг [52].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Clostridium tetani* /. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://www.wiki.uk-ua.nina.az/Clostridium_tetani.html
2. Diana Chapeton-Montes, Lucile Plourde, Cecile Deneve/ Tetanus Toxin Synthesis is Under the Control of A Complex Network of Regulatory Genes in *Clostridium tetani*/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32429286/>
3. Calvo A. C, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):6883-6901.
4. Internet Archive/ *Clostridium tetani*/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://web.archive.org/web/20090330051130/http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_home.jsp
5. Cuauhtemoc Licona-Cassaniac Jennifer A. Steena Nicolas E.Zaragozaa Glenn Moonenb George Moutafisb Mark P.Hodsonad/Tetanus toxin production is triggered by the transition from amino acid consumption to peptides / [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996416300907>
6. Одеський національний медичний університет Кафедра педіатрії №3 з післядипломною підготовкою/ Методичні рекомендації з лекцій для лікарів з теми Ранова інфекція. Правець/ Ст 3/ Режим доступу:
<https://resource.odmu.edu.ua/chair/download/73001/SiNbaKINtN7WnyBV9nnhg/%D0%BF%D1%80%D0%B0%D0%B2%D0%B5%D1%86%D1%8C.docx>
7. Thermic dehorning and ear tagging as atypical portals of entry of *Clostridium tetani* in ruminants / a. Spores and bacteria of *Clostridium tetani* with a typical drum-stick shape isolated from the crust of the dehorning wounds in case 1 (gram-staining-1000x). / [Електронний ресурс]. Режим доступу :

https://www.researchgate.net/figure/a-Spores-and-bacteria-of-Clostridium-tetani-with-a-typical-drum-stick-shape-isolated_fig1_277205153

8. ПАТОГЕННІ АНАЕРОБИ РОДУ CLOSTRIDIUM/ Методичні вказівки з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія»/ [Електронний ресурс].

Режим доступу:

<https://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/30601/1/%D0%A8%D1%82%D0%B0%D0%BD%D1%8E%D0%BA%20%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%96%20%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B8%20%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%20clostridium.pdf>

9. Elizabeth K. George; Orlando De Jesus; Renuga Vivekanandan./ National Library of Medicine / *Clostridium Tetani* / [Електронний ресурс]. Режим доступу :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482484/>

10. Центр громадського здоров'я МОЗ України/ Інструкція з експертної профілактики правця/ [Електронний ресурс]. Режим доступу :

<https://www.phc.org.ua/news/instrukciya-z-ekstrenoi-profilaktiki-pravcyu>

11. Вакцинація АДС-М-Біолік / Ефективна вакцина для ревакцинації від дифтерії та правця "АДС-М-Біолік"/ [Електронний ресурс]. Режим доступу :

<https://ksm-clinic.com.ua/ru/vaktsinatsiya-v-zaporozhe/vaktsinatsiya-ads-m-biolek-v-zaporozhe#:~:text=%D0%90%D0%94%D0%A1%2D%D0%9C%2D%D0%91%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%3A%20%D1%81%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%B2,%D0%9C%20%D0%BD%D0%B5%20%D1%81%D0%BE%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%B6%D0%B8%D1%82%20%D0%BA%D0%BE%D0%BA%D0%BB%D1%8E%D1%88%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%BD%D0%B0>

12. АКДП вакцина – інструкція, застосування, аналоги препарату/ Застосування АКДП вакцина/АКДП вакцина – склад і форма випуску препарату/АКДП вакцина: як приймати препарат/ АКДП вакцина – протипоказання, побічні ефекти/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://medicines.unian.ua/pharm/a/15899-akds-vakcina-instrukciya-primenenie-analogi-preparata>
13. Центр громадського здоров'я МОЗ України/ Календар щеплень/ Загальна інформація [Електронний ресурс]. Режим доступу :
<https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/imunizaciya/zagalna-informaciya>
14. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу АКДП-Біолік/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
[https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[27037](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[27037)
15. МОЗ України / Дифтерія небезпечніша за кір: чому необхідно вакцинуватися від дифтерії та правця/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://moz.gov.ua/article/immunization/difterija-nebezpechnisha-za-kir-chomu-neobhidno-vakcinuvatisja-vid-difterii-ta-pravcja>
16. Гудзевич Л.С. Стан вакцинопрофілактики дифтерії та правця в Україні // Актуальні питання географічних, біологічних та хімічних наук. Основні наукові проблеми та перспективи дослідження / Збірник наукових праць ВДПУ. - Вип. 17 (22). – Вінниця, 2019. – С. 88-92.
17. Мінфін / Чисельність населення України у 2018 р./ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://index.minfin.com.ua/reference/people/2018/>
18. Вікова структура населення України/ Динаміка частки вікових груп у населенні/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D1%96%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%B0_%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%82%D1%83%D1%8

[0%D0%B0 %D0%BD%D0%B0%D1%81%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BD
%D0%BD%D1%8F %D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%
D0%B8](http://www.vizio.com.ua/travmi/pravets/92-profilaktika-pravtsya.html)

19.Профілактика правця/ Препарати, які застосовуються для активної профілактики при планових щепленнях/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<http://vizio.com.ua/travmi/pravets/92-profilaktika-pravtsya.html>

20. РБК-Україна / Чому Україна не може налагодити власне виробництво вакцин/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://daily.rbc.ua/ukr/show/pochemu-ukraina-naladit-sobstvennoe-proizvodstvo-1488349119.html>

21. МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ/ Фармацевтичне управління/ Державний експертний центр Міністерства охорони здоров'я України /Державний реєстр лікарських засобів України/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

[http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%C0%CA%
C4%CF-%C1%B3%EE%EB%B3%EA](http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%C0%CA%C4%CF-%C1%B3%EE%EB%B3%EA)

22. Т. Пирог, Ю. Карлаш, В. Красінько / Основи проектування біотехнологічних виробництв / Методичні рекомендації до виконання курсового проекту/ Ст. 13-56.

23. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Clostridium tetani* E88/ [Електронний ресурс]. Режим доступу :

<https://www.genome.jp/entry/ctc00010>

24. Національний університет біоресурсів і природокористування України/ М.Д.Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць/ Промислова Біотехнологія/ Ст-46-48

25. Інституційний репозитарій Національного університету харчових технологій/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://dspace.nuft.edu.ua/server/api/core/bitstreams/69095294-ac2c-4b35-80f4-afce496d5097/content>

26. Інститут Біотехнології та екологічного контролю/ Культивування *Bifidobacterium bifidum* для одержання Біфідумбактерину/ Макаренко Дар'я Олександрівна/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:
file:///C:/Users/%D0%90%D0%BB%D0%B8%D1%81%D0%B0/Downloads/Telegram%20Desktop/162_Makarenko%20Daria%20Oleksandrivna.pdf
27. МАНКОР: Лабораторний посуд і обладнання/ Мембранні фільтри з поліетилсульфону (PES). Франція/[Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://mankor.ua/ua/membrannye-filtry-iz-poliefirsulfona-pes-frantsiya.html>
28. Хлорка/ Дезінфікуючі засоби/ Мікробак форте, 5 л/[Електронний ресурс].
Режим доступу:
[https://hlorka.in.ua/ua/p279670722-mikrobak-forfte.html#:~:text=%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D0%BA%20%D1%84%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B5%20\(Mikrobac%20forte\)%20%E2%80%94,%D0%B4%D0%B0%D0%B6%D0%B5%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%20%D0%B2%D1%8B%D1%81%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B9%20%D0%B1%D0%B5%D0%BB%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B9%20%D0%BD%D0%B0%D0%B3%D1%80%D1%83%D0%B7%D0%BA%D0%B5](https://hlorka.in.ua/ua/p279670722-mikrobak-forfte.html#:~:text=%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D0%BA%20%D1%84%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B5%20(Mikrobac%20forte)%20%E2%80%94,%D0%B4%D0%B0%D0%B6%D0%B5%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%20%D0%B2%D1%8B%D1%81%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B9%20%D0%B1%D0%B5%D0%BB%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B9%20%D0%BD%D0%B0%D0%B3%D1%80%D1%83%D0%B7%D0%BA%D0%B5)
29. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік/ Засіб дезінфекційний Мікробак / [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020_%

[D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf](https://www.dzo.com.ua/tenders/catalog/products/2445-TVBN-4820171400296-280347)

30. Державні закупівлі онлайн /Дезінфікуючий засіб "ДЕЗМАКС", порошок, 1кг/[Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://www.dzo.com.ua/tenders/catalog/products/2445-TVBN-4820171400296-280347>

31. ІНСТРУКЦІЯ по застосуванню дезінфікуючого засобу «Дезмакс» у формі порошку, гранул і таблеток з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://drive.google.com/file/d/1a236SBeRBtAhdGbdKjLyV8TOtBnY6l11/view?pli=1>

32. I. Gutiérrez, E. Garzón, P. Vargas, N. Moreno, R. Poutou/ INFLUENCE OF SODIUM GLUTAMATE, BUBBLING N₂- GAS AND SUPERFICIAL AERATION ON TETANUS TOXIN PRODUCTION IN Clostridium tetani CULTURES/ ISSN: 0122-7483/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://www.redalyc.org/pdf/499/49910208.pdf>

33. Загальні технології харчової промисловості / Методичні вказівки до виконання лабораторного практикуму / Визначення вмісту амінного азоту.../ А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К: НУХТ, 2011- 31 с / [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>

34. Ферментер New Brunswick BioFlo310 и лабораторный ферментер и биореактор CelliGen310 / [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<http://www.veld.kz/img/docs/3327.pdf>

35. SYSTEMS ENGINEERING / Перистальтический насос SEKO PR-1, пропорциональный расход 0,15-1 л/ч, 3 бар, SEKOBRIЛ/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://dosingtech.com.ua/product/peristalticheskij-nasos-seko-pr-1-proporsionalnyj-rashod-0-15-1-1-ch-3-bar-sekobril/>

36. Seko/ Насос дозирующий цифровой Seko pH/Rx TPR803 Tekna EVO 20-110 л/ч - 2 BAR/[Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://prom.ua/p1835462402-nasos-doziruyuschij-tsifrovoj.html>

37. Systec /Автоклави з вертикальним завантаженням Systec VX / [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://unilab.kiev.ua/catalog/avtoklavy/Systec%20VX/>

38. Експериментальна частина/ Визначення масової частки цукру/ [Електронний ресурс]. Режим доступу:

https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lab_prakt/310.html

39. Ламінарна шафа HR40-II-A2 Haier/ Технічні характеристика / Опис / [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://ukranalitika.com.ua/ua/goods/laminarnye-shkafy/laminarnyi-shkaf-hr40-ii-b2-haier>

40. Т.П. Пирог, О.І. Скроцька/ Конспект лекцій / Загальна мікробіологія/ Національний університет харчових технологій/ Ст- 18-20. / Режим доступу:

<file:///E:/%D0%9D%D0%A3%D0%A5%D0%A2/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%81%D0%BF%D0%B5%D0%BA%D1%82%20%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9.pdf>

41. В.О. Красінько/ Конспект лекцій/ Методи контролю в біотехнологічних, фармацевтичних та харчових виробництвах/ Національний університет харчових технологій/ Ст: 30-37.

42. Fang, A., Gerson, D. F., & Demain, A. L. Menstrum for culture preservation and medium for seed preparation in a tetanus toxin production process containing no animal or dairy products. Letters in Applied Microbiol., 2006, 43(4), 360–363.

43. Н. Н. Митрофанова, В.Л. Мельників/ Навчально-методичний посібник / Імунологія / Медичний інститут кафедра «Мікробіології, епідеміології та інфекційних хвороб»/ Ст: 50-57
44. Van Ramshorst, J. D., Rijks H. The flocculation of tetanus toxin and toxoid. I. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1974. 20(1), 17–32.
45. G. C. Mead/ The Amino Acid-fermenting Clostridia/ [Електронний ресурс].
Режим доступу:
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-67-1-47>
46. Загальні технології харчової промисловості / Методичні вказівки до виконання лабораторного практикум / Визначення вмісту амінного азоту.../ А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К: НУХТ, 2011- 31 с / [Електронний ресурс].
Режим доступу:
<https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>
47. Production, Optimization of Detoxification and Ammonium Sulphate Precipitation of Ultrafiltered Tetanus Toxin/ Solan (H.P.), Kasauli (H.P.), Dehradun (UK), [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/91296545/sciflora_2C_Journal_manager_2C_7490-20620-1-CE.pdf_filename_UTF-8sciflora_2C_Journal_manager_2C_7490-20620-1-CE-libre.pdf?1663670423=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DProduction_Optimization_of_Detoxificatio.pdf&Expires=1716750883&Signature=AA62AaCJnXi3wD38g0mvYdL-zWVTdNe-JQPe8WVeD5ZziVS6sPRINf6x6a-TvaDk32b1MsYZNE4xGEHQ0GIynCJQD20iykGC8ouJrQ4oT9ELPl0TUqdWPwZhvTId6HVl-RYSWgZcbNmhu7iaIIOf7YErPGe5HZ73SWJM8GOkmEhNaN9QW92mPVWmUj4y-JAZ15tXSNgHLA2-

[9NVBFt~2oleI9xKOIMBJie4mPK70uRy1j3Qa2VlplR9q2N5mSLE0pzBb6daToScl
eHrWCP1JBBFi44fqxfl0alSCT6ivNJXKPoElW-
HclAydqiDckmyeaBulL6Lsrs~ax~bVJDtg__&Key-Pair-
HclAydqiDckmyeaBulL6Lsrs~ax~bVJDtg__&Key-Pair-
Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://doi.org/10.1016/j.jobb.2022.11.002)

48. Біологічна небезпека та рівні біологічної безпеки / [Електронний ресурс].

Режим доступу :

<http://laborant.net/specialist/publications/lamboxarticle/83/>

49. Clostridium tetani growth and toxin production in the intestines of germfree rats/ C
L Wells, E Balish/ DOI: 10.1128/iai.41.2.826-828.1983/[Електронний ресурс].

Режим доступу :

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6347898/>

50.L. Levine, J. L. Stone/ The Purification of Tetanus Toxoid by Ammonium Sulfate
Fractionation/ CABI Record Number: 19522700597/ [Електронний ресурс].

Режим доступу:

<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19522700597>

51 Biosafety and biosecurity in the era of biotechnology: The Middle East region/Laith
AL-Eitan, Malek Alnemri / [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://doi.org/10.1016/j.jobb.2022.11.002>

52 ЗАКОН УКРАЇНИ Про управління відходами/ Відомості Верховної Ради
(ВВР), 2023, № 17, ст.75/ Розділ I. загальні положення / [Електронний ресурс].

Режим доступу:

<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2320-20#Text>