

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » червня 2022 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » червня 2022 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 виробництва компоненту проти правця вакцини АКДП

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 1

ПАЛЬКО Леся Олексіївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Оксана Янчук

(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 – 2022 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 СТАБНІКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПАЛЬКО Лесі Олексіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Clostridium tetani* для виробництва компоненту
проти правця вакцини АКДП

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, доц., канд. біол. наук,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Clostridium tetani* Harvard 49205,
цільовий продукт: тетанотоксин; геометричний об'єм ферментеру: 10 л.; коефіцієнт
заповнення — 0,7.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ
1. Характеристика тетанотоксину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація
обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми процесу біосинтезу правцевого
токсину. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва тетанотоксину – 1 аркуш формату А1.
Апаратна схеми виробництва тетанотоксину – 1 аркуш формату
А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика тетанотоксину	04.04.2022 – 11.04.2022	виконано
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.2022 – 20.04.2022	виконано
3	Техніко-економічне обґрунтування	20.04.2022 - 27.04.2022	виконано
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.04.2022 – 2.05.2022	виконано
5	Специфікація обладнання	2.05.2022 – 6.05.2022	виконано
6	Опис технологічної схеми процесу біосинтезу правцевого токсину	6.05.2022 – 13.05.2022	виконано
7	Контроль виробництва	13.05.2022 – 20.05.2022	виконано
8	Оформлення пояснювальної записки	20.05.2022 – 26.05.2022	виконано
9	Виконання графічної частини проекту	26.05.2022- 01.06.2022	виконано

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Леся ПАЛЬКО _____
(ім'я та прізвище)

Оксана СКРОЦЬКА _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота «Культивування *Clostridium tetani* для виробництва компоненту проти правця вакцини АКДП».

Проект присвячений технології виробництва вакцини АКДП для первинної імунізації та ревакцинації. Готовий препарат використовується у якості протиправцевої профілактики.

В якості продуцента тетанотоксину був обраний *Clostridium tetani* Harvard 49205, який характеризується високою стабільністю, вищим синтезом токсину, в порівнянні з іншими продуцентами та оптимізованим поживним середовищем, в якому традиційний субстрат (гідролізат казеїну) замінений гідролізатом сої, що дозволяє уникнути використання сировини тваринного походження, яка пов'язана з певними ризиками.

Для даного проекту здійснене техніко-економічне обґрунтування, згідно з яким обрахована потужність виробництва, а саме 63,7 л. культуральної рідини за 9 виробничих циклів. Обраний ферментер місткістю 10 л. В роботі обґрунтовані та наведені технологічна та апаратурна схеми виробництва правцевого анатоксину, що окреслюють доферментаційні процеси та біосинтез. Технологічна схема біосинтезу правцевого токсину включає допоміжні роботи (підготовка розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (стадії підтримання та вирощування посівного матеріалу, біосинтез у ферментері об'ємом 10 л).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 7 розділів, списку використаних джерел, графічної частини.

Ключові слова: вакцина, тетанотоксин, біосинтез, профілактика, *C. tetani* Harvard 49205.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика тетанотоксину.....	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	16
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	19
3.1. Потреби України у вакцині для профілактики правця.....	19
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	21
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	23
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	25
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	25
4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера.....	25
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря..	26
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	27
4.1.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища..	30
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	33
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми процесу біосинтезу правцевого токсину....	36
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	43
7.1. Мікробіологічний контроль	43
7.2. Концентрація біомаси.....	44

7.3. Концентрація тетанотоксину.....	44
7.4. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену.....	46
7.4.1. Визначення амінного азоту.....	46
7.4.2. Визначення глюкози.....	47

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ВСТУП

Вакцинація в теперішній час розглядається як загально визнаний ефективний спосіб профілактики ряду небезпечних інфекційних захворювань. На сьогоднішній день, вакцинація населення в нашій державі є регулярною та частково обов'язковою. [1]

Вакцини – це спеціально розроблені форми імуногенів, що використовуються для імунізації людини і тварини з метою продукції протективного по відношенню до певної хвороби імунітету. З цією метою застосовуються живі, інактивовані, хімічні вакцини та анатоксини. Вакцини можуть бути у вигляді монопрепаратів для імунізації проти одного інфекційного захворювання та асоційованих препаратів для імунізації проти декількох інфекційних захворювань. До останніх, асоційованих вакцин, відноситься АКДП, що містить дифтерійний та правцевий анатоксини та інактивовану біомасу збудника коклюшу. [2]

Оскільки, такі хвороби як коклюш, правець та ряд інших важко піддаються лікуванню, попередня вакцинація – найкращий спосіб уникнути цих захворювань. Це дозволить в найкоротші терміни знизити захворюваність інфекційними хворобами і повністю ліквідувати деякі з них. Практично при всіх інфекційних захворюваннях на сьогоднішній день у дітей у десятки і сотні разів знижена летальність, що стало однією із важливих причин зниження дитячої смертності. [3]

Саме тому, необхідність імунізації населення, як основи профілактики багатьох інфекційних захворювань на сьогоднішній день має бути обов'язковою. Слід зазначити, що сучасні вакцинні препарати володіють високою імуногенністю та слабкою реактогенністю завдяки оптимізації виробничого процесу та вивченню структури збудників. Тому, в найкращому випадку, вакцинопрофілактика повинна бути невід'ємною частиною комплексу заходів охорони здоров'я суспільства, що підтримана державою з фінансової, матеріально-технічної, наукової і законодавчої сторін.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Палько Л. О.</i>						6	536
<i>Керівник</i>	<i>Скрацька О. І.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В. П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕТАНОТОКСИНУ

Тетанотоксин – біологічно активна речовина, токсин *Clostridium tetani*, що є збудником правцю. Токсин включає в себе дві фракції – тетаноспазмін і тетанолізін. Тетанолізін виділяється з клітин з перших днів розвитку культури за допомогою механізму активного транспорту. Тетаноспазмін виділяється в культуральну рідину лише при розпаді мікробних клітин, головним чином, в фазі їх прискореної загибелі, тому він накопичується в культурі до 5-7 дня інкубації.[5] Тетаноспазмін синтезується внутрішньоклітинно у вигляді неактивного прототоксину - лінійного пептиду з молекулярною масою приблизно 150 кДа, який складається з 1315 амінокислотних залишків. Потім прототоксин активується за рахунок протеолітичного розщеплення цинк-залежною протеазою відкритої петлі в структурі своєї молекули. Дволанцюгова активована молекула складається з важкого ланцюга (100 кДа) і легкого ланцюга (50 кДа), пов'язаних між собою дисульфідним зв'язком.[6]

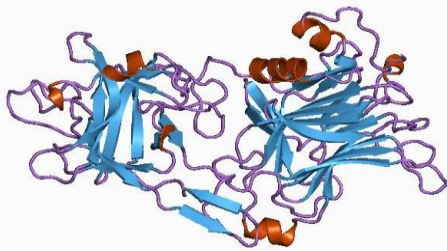


Рис. 1.1 Структура важкого ланцюга

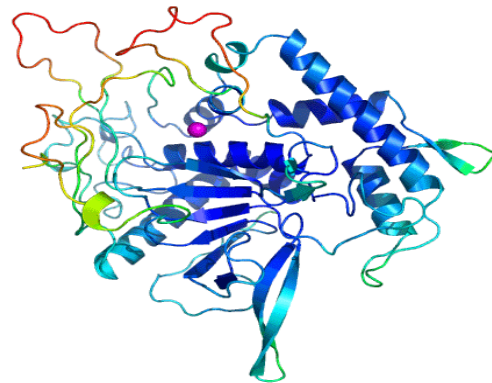


Рис 1.2 Структура легкого ланцюга

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика тетанотоксину</i>					
<i>Розробник</i>	<i>Палько Л. О.</i>							<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшв</i>
<i>Керівник</i>	<i>Скрацька О. І.</i>								<i>8</i>	<i>53</i>
<i>Н. контр</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>										
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В. П.</i>				<i>8</i>					

Володіє високою токсичністю, летальна доза для білих мишей становить лише 0,001 мкг/кг, для людей приблизно 0,2 мг. Токсичний білок термолабільний і після 20-25 хвилин нагрівання при 60-62 втрачає активність. Після потрапляння в шлунково-кишковий тракт швидко інактивується пептидазами. [7]

Головними токсичними властивостями клостридіального токсину наділений тетаноспазмін. При надходженні в організм токсин потрапляє в кровоносну і лімфатичну систему, заповнює їх і потім надходить в нервові стовбури, досягаючи рухових центрів передніх рогів спинного мозку і стовбура головного мозку. Правцевий токсин спочатку зв'язується з рецепторами на пресинаптичній мембрані моторних нейронів, але потім, за допомогою ретроградного везикулярного транспорту, він переміщається в нейрони спинного мозку. Тетаноспазмін вибірково вражає структури мозку, відповідальні за функцію центрального гальмування (так звані вставні нейрони), синапси полісинаптичних рефлекторних дуг, за рахунок чого випадають гальмівні реакції рухового процесу при збереженні реакцій збудження. У більшості випадків синаптичні ураження можуть бути незворотними через істотне ураження їх нейроферментативних систем. Дія тетаноспазміну на центри головного мозку проявляється гіпертермією, лихоманкою, артеріальною гіпертензією. Тетанолізін викликає гемоліз еритроцитів, може руйнувати лейкоцити, володіє кардіотоксичними властивостями.[8,9,10]

Тетанотоксин, який дезактивацією перетворюють у анатоксин, широко використовується у виготовленні вакцин для профілактики захворюваності правцем. Правець простіше попередити, ніж лікувати, оскільки лікування правця навіть при використанні найсучасніших методів є складновирішуваною проблемою, з великою частотою летальних випадків та інвалідності. Захист від правця створюється шляхом імунізації АКДП-вакциною та АДП-анатоксином, АП-анатоксином. Анатоксин, у подібних вакцинах, адсорбований на ад'юванті, такому як фосфат алюмінію чи гідроксид алюмінію. Повний курс первинної імунізації передбачає первинну вакцинацію, що включає три щеплення АКДП-вакциною з інтервалом в 1 місяць та першу ревакцинацію, яку проводять у 18

місяців життя. Для підтримки імунітету проти правцю на достатньому рівні необхідно періодично з інтервалом 10 років проводити ревакцинацію шляхом одноразового введення АП-анатоксину.[11]

Виробником АКДП-вакцини та АДП-анатоксину в Україні є АТ «Біолік»:

АКДП-Біолік (Адсорбована коклюшно-дифтерійно-правцевим вакцина) – це бактеріальна вакцина, яка складається з суспензії убитих кашлюкових мікробів і очищених дифтерійного та правцевого анатоксинів, сорбованих на гелі гідроксиду алюмінію. АКДП-Біолік випускається у формі суспензій для ін'єкцій, жовтувато-білого кольору, при відстоюванні розшаровується на прозору надосадову рідину та пухкий осад, який повністю розбивається при струшуванні.

АДП-Біолік (адсорбований дифтерійно-правцевий анатоксин) – препарат складається із суміші очищених дифтерійного та правцевого анатоксинів, адсорбованих на гелі алюмінію гідроксиду. Лікарська форма аналогічна до АКДП-Біолік. [12]



Рис. 1.3 Препарат АКДП-Біолік

РОЗДІЛ 2

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Єдиним продуцентом тетанотоксину є бактерія *Clostridium tetani*. Чиста культура збудника отримана у 1889 році С. Кітазато. Він разом з Е. Берінгом в 1890 році отримав правцевий токсин і запропонував використовувати для лікування правця антитоксичну протиправцеву сироватку. У 1923-26 роках французькому досліднику Г. Рамону вдалося отримати правцевий анатоксин шляхом тривалого впливу на токсин формаліном при температурі 39-40 ° С, який в подальшому стали застосовувати для запобігання захворювання.[13]

Згідно літературних даних розглянемо різні штами *C. tetani*, що використовуються в промислових масштабах для одержання токсину. Узагальнені дані наведені у таблиці 2.1. Так, найбільшу кількість тетанотоксину синтезує *C. tetani* Harvard 49205 (98 лф/мл), тоді як, *C. tetani* Harvard-Caracas – 75 лф/мл, а *C. tetani* Massachusetts – 73 лф/мл, проте тривалість культивування штамів є різною. При вирощуванні кожного з продуцентів використовують складні багатокомпонентні середовища, що містять фактори росту. Та перевагою середовища, що використовувалося для культивування *C. tetani* Harvard 49205 є використання гідролізату соєвого білка замість гідролізату казеїну. Відсутність продуктів тваринного походження спростить етап очищення культуральної рідини та є більш економічно вигідним.

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, вартість середовища для *C. tetani* Harvard 49205 є нижчим, ніж для *C. tetani* Harvard-Caracas та *C. tetani* Massachusetts. Проте, тривалість культивування штаму *C. tetani* Harvard 49205 є найдовшою.

НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ

Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Палько Л. О.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літера	Аркш	Аркшів
Керівник		Скрацька О. І.					11	53
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стадніков В. П.						

Тому, для остаточного вибору розрахуємо умовну вартість нашого цільового продукту у таблиці 2.3. Згідно розрахованих даних, умовна вартість тетанотоксину, синтезованого *C. tetani* Harvard 49205 є найнижчою (0,051 од/грн.). Проаналізувавши склад поживних середовищ, умов культивування, концентрацію продукту, умовну вартість можна зробити висновок, що найкращим продуцентом є *C. tetani* Harvard 49205. [14,15,16]

Таблиця 2.1. Особливості одержання тетанотоксину

Біологічний агент	Склад пож. сер.		Тривалість культивування, год	Вихід токсину, Лф/мл	Особливості процесу	Використана література
	Компонент	Концентрація, г/л				
<i>Clostridium tetani</i> Massachusetts	Гідролізат казеїну	33,3	82	73	Ферментер місткістю 7 л. з 5 л. середовища (t = 35°C; n = 100 об/хв; pH = 7,1). Ферментація проводилася з барботуючим потоком азоту швидкістю 0,33 л/хв до кінця експоненційної фази росту.	Vargas, P. & Gutiérrez, Ivonne & Garzón, E. & Moreno, Nubia & Poutou-Piñales, Raúl. Influence of sodium glutamate, bubbling N2-gas and superficial aeration on tetanus toxin production in <i>Clostridium tetani</i> cultures. <i>Universitas Scientiarum</i> . 2005,10. 79-86.
	Глюкоза	8				
	CaCl ₂	0,8				
	K ₂ HPO ₄	1,1				
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1				
	NaCl	2,5				
	Гідрохлорид тيامіну	0,0025				
	Рибофлавін	0,0025				
	Піридоксин	0,0025				
	Пантотенова к-та	0,01				
	Ціанокобаламін	0,00025				
	Нікотинова к-та	0,00025				
	Урацил	0,0013				
	L-цистеїн	0,13				
Глутамат натрію	2,5					
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,32					

<i>Clostridium tetani</i> Harvard 49205	Гідролізат соєвого білка (Hy-Soy) Глюкоза Цистеїн Тирозин NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O Порошок заліза	35 7 0,125 0,125 5 0,5 0,175 0,5 0,5	168	98	Культивування проводилося у ферментері на 2 л. Об'єм середовища становив 1 л. (t= 35°C; pH = 7,5)	Chawla, Anil & Das, Chandrani & Singh, Paramdeep & Tiwari, Mansha & Chaudhary, Seema. Production of tetanus toxin by using media substantially free from meat and blood. 2016, 9. 284-287.
<i>Clostridium tetani</i> Harvard-Caracas	Гідролізат казеїну Глюкоза NaCl MgSO ₄ Вітамін B12 L-цистеїн Біотин Нікотинова к-та Рибофлавін Піридоксин Урацил Тиамін Пантотенова к-та FeCl ₃ · 6H ₂ O	25 8 2,5 0,1 0,005 0,125 0,025 0,0025 0,0025 0,0025 0,0025 0,0025 0,1 0,32	96	75	Культивування проводили у 500 мл колбах з 300 мл середовища, герметично закритими бавовняними пробками в анаеробному боксі. (t= 36°C, pH = 7,4)	Fratelli F, Siquini TJ, Prado SM, Higashi HG, Converti A, de Carvalho JC. Effect of medium composition on the production of tetanus toxin by <i>Clostridium tetani</i> . <i>Biotechnol Prog.</i> 2005, 56-61.

Вартість поживних середовищ для культивування *Clostridium tetani*

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л. середовища	Джерело інформації
<i>Clostridium tetani</i> Massachusetts	Гідролізат казеїну	33,3	2750	91,5	5
	Глюкоза	8	35	0,28	2
	CaCl ₂	0,8	27	0,022	2
	K ₂ HPO ₄	1,1	60	0,066	2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	12	0,0012	2
	NaCl	2,5	4,5	0,0011	3
	Гідрохлорид тiamіну	0,0025	1950	0,0049	2
	Рибофлавін	0,0025	1480	0,0037	2
	Піридоксин	0,0025	1850	0,0046	2
	Пантотенова к-та	0,01	2900	0,029	2
	Ціанокобаламін	0,0025	2150	0,0054	2
	Нікотинова к-та	0,0025	249	0,0006	4
	Урацил	0,0013	335	0,0004	1
	L-цистеїн	0,13	950	0,124	2
	Глутамат натрію	2,5	50	0,125	1
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,32	46,2	0,015	4	
Вартість 1 л. середовища – 92,2 грн.					
<i>Clostridium tetani</i> Harvard 49205	Гідролізат соєвого білка	35	130	4,55	2
	Глюкоза	7	35	0,25	2
	NaCl	5	4,5	0,023	3
	Na ₂ HPO ₄	0,5	75	0,038	4
	KH ₂ PO ₄	0,175	120	0,021	1
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	11,4	0,006	1
	Цистеїн	0,125	950	0,12	2
	Тирозин	0,125	1352	0,17	2
	Порошок залізний	0,5	69	0,04	2
	Вартість 1 л. середовища – 5,22 грн.				
<i>Clostridium tetani</i> Harvard- Caracas	Гідролізат казеїну	25	2750	68,75	5
	Глюкоза	8	35	0,28	2
	NaCl	2,5	4,5	0,0011	3
	MgSO ₄	0,1	12	0,0012	1
	Вітамін B12	0,005	2150	0,011	2

	Л-цистеїн	0,125	950	0,12	2
	Біотин	0,025	580	0,015	2
	Нікотинова к-та	0,0025	249	0,0006	4
	Рибофлавін	0,0025	1480	0,0037	2
	Піридоксин	0,0025	1850	0,0046	2
	Урацил	0,0025	335	0,0008	1
	Тиамін	0,0025	1950	0,0049	2
	Пантотенова к-та	0,1	2900	0,029	2
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,32	46,2	0,015	4
Вартість 1 л. середовища – 69,24 грн.					

Примітка.* - Ціни наведено станом на січень 2021 р. 1 - <https://flagma.ua/uk/>, 2 - <https://prom.ua/ua/>, 3 - <https://himfarminvest.com.ua/>, 4 - <https://www.systopt.com.ua/>, 5 - <http://agar.com.ua/>.

Таблиця 2.3

Умовна вартість тетанотоксину, синтезованого на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація токсину, лф/мл.	Тривалість культивування, год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість цільового продукту, (лф/мл)/грн
<i>Clostridium tetani</i> Massachusetts	73	82	92,2	1,26
<i>Clostridium tetani</i> Harvard 49205	98	168	5,22	0,053
<i>Clostridium tetani</i> Harvard-Caracas	75	96	69,24	0,92

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

Clostridium tetani Harvard 49205 – грампозитивні паличкоподібні бактерії, розмір яких лежить у межах 4-8x0,3-0,8 мкм. Рухома, джгутики розміщені по всій поверхні. Не утворює капсул. За несприятливих зовнішніх умов утворює спори круглої форми, що розташовуються термінально (на кінцях). Діаметр спори перевищує поперечний розмір вегетативної клітини, тому клітини зі спорами мають форму так званої «барабанної палички». [16] (рис. 2.1)

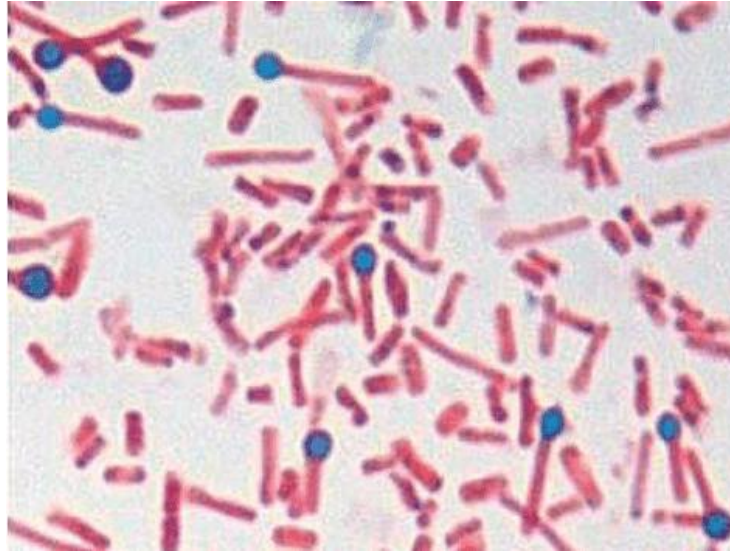


Рис 5.1. *Clostridium tetani* Harvard 49205 форма вегетативних клітин та спор, збільшення в $\times 1000$ [17]

Спори володіють стійкістю до висушування, виживають при кип'ятінні та обробці дезінфікуючими засобами. Вегетативні форми, відповідно, чутливі до зовнішніх факторів, швидко гинуть в несприятливих умовах і чутливі до деяких антибіотиків, наприклад, метронідазолу. Спори можуть зберігатися в ґрунті та пилі до декількох років.[18]

Ріст спостерігається на різноманітних поживних середовищах, але найчастіше використовують середовища з гідролізатом казеїну. У рідких середовищах при рості спостерігається помутніння, на агаризованих середовищах має вигляд прозорих, інколи білуватих колоній з блиском. В шарі цукрового агару колонії мають вигляд, подібний шматочкам вати; на кров'яному агарі росте у вигляді тонкого наліту, з зоною гемолізу. [19]

Бактерії виду *C. tetani* є облігатними анаеробами. Оптимальна температура для їх росту варіює в межах $33-37^{\circ}\text{C}$. Оптимальний діапазон $\text{pH} = 7,1 - 7,6$. За типом живлення – хеморганогетеротроф. Не здатні катаболізувати більшість вуглеводів. Розріджують желатин з газоутворенням, повільно пептонізують молоко. *C. tetani* володіє фібринолітичною активністю. Важливою особливістю біологічного агента є здатність до продукування токсину, що класифікується третім рівнем патогенності.

C. tetani є збудником правцю, сапронозної інфекційної хвороби, що вражає нервову систему. [20]

2.3 Таксономічний статус

Сучасна класифікація для *Clostridium tetani* Harvard наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій.

Домен – *Bacteria*.

Відділ – *Firmicutes*.

Порядок- *Clostridia*.

Клас – *Clostridiales*.

Родина – *Clostridiaceae*.

Рід – *Clostridium*.

Вид – *Clostridium tetani*. [21]

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреби населення України у вакцині для профілактики правця

Правець складно піддається лікуванню, тому найкращим варіантом уникнення є попередня вакцинація. Це дозволить в найкоротші терміни знизити захворюваність. Практично при всіх інфекційних хворобах, проти яких ведеться імунізація, на сьогоднішній день у десятки і сотні разів знижена летальність.[22]

Тетанотоксин, який деактивацією перетворюють у анатоксин, широко використовується у виготовленні вакцин для профілактики захворюваності правцем.

Захист від правця створюється шляхом імунізації АКДП-вакциною та АДП-анатоксином, АП-анатоксином. Анатоксин, у подібних вакцинах, адсорбований на ад'юванті, такому як фосфат алюмінію чи гідроксид алюмінію.

Щеплення для профілактики правця проводяться за віком: у 2 місяці (перше щеплення), у 4 місяці (друге щеплення), у 6 місяців (третє щеплення) та у 18 місяців (четверте щеплення). Вакцинацію першими 4 дозами проводять вакциною АКДП . Ревакцинацію проти дифтерії та правця у 6 років проводять анатоксином дифтерійно-правцевим (далі – АДП), наступну у 16 років – анатоксином дифтерійно-правцевим зі зменшеним вмістом антигену (далі – АДП-М). Першу планову ревакцинацію дорослих за віком та епідемічними показаннями, які раніше були щеплені, проводять АДП-М у віці 26 років з подальшою плановою ревакцинацією АДП-М з мінімальним інтервалом 10 років від попереднього щеплення АДП-М.[23]

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Палько Л. О.</i>					19	53
<i>Керівник</i>		<i>Скороцька О. І.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В. П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
							19	

Одноразова доза для новонароджених дітей і пацієнтів віком до 6 років – 10 флокуюючих одиниць правцевого анатоксину. Для пацієнтів від 16 років і старше – 5 флокуюючих одиниць правцевого анатоксину.

Згідно даними Держстату за 2020 рік кількість новонароджених в Україні становить 293,5 тисячі. Тобто, щоб забезпечити потребу у вакцинації пацієнтам до 18 місяців (4 дози) потрібно:

$$10 \text{ фл. од.} \times 4 \text{ дози} \times 293500 \text{ дітей} = 11740000 \text{ фл. од.}$$

Кількість 6-річних пацієнтів на 2020 рік становить 465 900. Щоб забезпечити потребу, необхідно:

$$10 \text{ фл. од.} \times 1 \text{ доза} \times 465\,900 \text{ дітей} = 4659000 \text{ фл. од.}$$

Кількість 16-річних на 2020 рік становить 428965. Для забезпечення потреби необхідно:

$$5 \text{ фл. од.} \times 1 \text{ доза} \times 428965 = 2144825 \text{ фл. од.}$$

Враховуючи, що середня тривалість життя в Україні коливається 63-73 років, для планової ревакцинації кожні 10 років потрібна 1 доза, враховуючи середню тривалість життя загальна кількість доз в середньому складає 5. Кількість людей станом на 2020 рік, яким необхідно проводити ревакцинацію становить 2889240.[24]

$$5 \text{ фл. од.} \times 1 \text{ доза} \times 2889240 = 14446200 \text{ фл. од.}$$

Загальна потреба у правцевому анатоксині складе:

$$11740000 \text{ фл. од.} + 4659000 \text{ фл. од.} + 2144825 \text{ фл. од.} + 14446200 \text{ фл. од.} = 32990025 \text{ фл. од.}$$

Потреба населення в вакцині проти правцю

Категорії хворих	Доза препарату, од. фл.	Кількість доз	Кількість потребуючих, тис.	Кількість препарату на річний курс вакцинації, фл. од.
Діти (до 18 місяців)	10	4	293,5	11 740 000
Діти (6 років)	10	1	465,9	4 659 000
Особи 16 років	5	1	428,965	2 144 825
Дорослі	5	5	2889,24	14 446 200
Всього				32 990 025

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Згідно з «Державним реєстром лікарських засобів України» в Україні зареєстровано кілька вакцин для профілактики правцю, в тому числі і комбінованих: АДП-М-Біолік, АДП-Біолік, Діфтет (ДП-вакцина) вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована); вакцина для профілактики дифтерії, правця та кашлюку, адсорбована, з цільноклітинним кашлюковим компонентом (виробник СЕРУМ ІНСТИТУТ ІНДІЇ ПВТ. ЛТД., Індія); БУСТРИКС™ комбінована вакцина для профілактики дифтерії, правця та кашлюку (ацелилярний компонент) (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигенів).[25]

За державні кошти закупається тільки вакцина АКДП виробництва СЕРУМ ІНСТИТУТ ІНДІЇ. За даними МОЗ, на 1.08.2018 було закуплено 2460860 доз вакцини, що покрило потребу на той рік. Щодо українського виробництва, на ринку представлені вакцини від АТ "БІОЛІК", Україна.

Приймаємо потребу забезпечити нашою вакциною вітчизняного виробництва найбільш вразливий до правця відсоток населення України, а саме старше населення Чернівецької області. Це пов'язано з двома критичними факторами – вікова структура захворілих (85 % є людьми похилого віку) та наявність територій з високим ризиком зараження, де ступінь обсіменіння ґрунтів правцевою паличкою складає 95-98%, адже в Україні простежується зональне районування збудників правцю. [26,27]

Від загальної потреби кількість флокулюючих одиниць токсину відповідно до встановленої потреби становить 355320.

Продуцент правцевого токсину - *Clostridium tetani* Harvard 49205 синтезує 98 од. фл/мл.

Умовно приймаємо 98 од. фл/мл за 1 мг токсину.

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 355320 флокулюючих одиниць становить:

98 од.фл – 1 мг;

355320 од.фл. – X;

X = 3625,7 мг

98 мл – 1 л;

3625.7 – X;

X = 37 л культуральної рідини.

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (42 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:
 $V_{кр.} = 37 / (1 - (0,02 + 0,1 + 0,2 + 0,1)) = 63,7$ л

3.3 Розрахунок об'єму ферментеру та кількості виробничих циклів

Для забезпечення потреб населення потрібно одержати (з врахуванням втрат при виділенні) 63,7 л культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 100, тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = V_{гп} / Трд = 63,7 / 100 = 0,64 \text{ л.}$$

Кількість культуральної рідини за цикл ($V_{кр}$) буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф}) / 24 = (1,5 \cdot 0,64 \cdot 174,5) / 24 = 7 \text{ л/цикл,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (168 год) та час підготовки ферментера до роботи (6,5 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд апарата (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження апарату (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год).

7 л культуральної рідини ($V_{кр}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$V_{г} = V_{кр} / K_{зап} = 7 / 0,7 = 10 \text{ л}$, де $K_{зап} = 0,7$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

У таблиці (див. додаток 4) знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{ф} = 10 \text{ л}$, уточнення коефіцієнта заповнення не потрібно.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу тетанотоксину *Clostridium tetani* Harvard 49205

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 7 \text{ л}$ культуральної рідини.

Так як при культивуванні продуценту не використовується аераційне повітря, показник краплевиносу не обраховується.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 7 \text{ л}$.

При обраному коефіцієнті заповнення $K_{зап}$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментатора ($V_{ф}$), що становить $V_{ф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 7 / 0,7 = 10 \text{ л}$.

Приймаємо рівний за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10$ л (див. додаток 4).

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

Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде складати:

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + Xф) = 7 / (1 + 0,1) = 6,36$ л, де $Xф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 7 - 6,36 = 0,64$ л.

Таку кількість інокуляту для засіву ферментера можна отримати в лабораторних умовах, використовуючи колби та створюючи анаеробні умови.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу правцевого токсину у ферментері об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити в один етап – лабораторне вирощування в колбах. За результатами розрахунків приймаємо для встановлення один ферментер об'ємом 10 л.

РОЗДІЛ 4

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1 Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Бактерії виду *C. tetani* є облигатними анаеробами. Оптимальна температура для їх росту варіює в межах 33-37 °С, тобто вони належать до мезофілів. Оптимальний діапазон рН = 7,1 – 7,6. Зважаючи на це, існує високий ризик контамінації сторонніми нейтрофільними та мезофільними анаеробними мікроорганізмами. Окрім цього даний продуцент є патогенним мікроорганізмом. Тому при культивуванні потрібно забезпечувати асептичні умови, а при роботі з культурою дотримуватися відповідних правил безпеки та роботи з патогенами. Повинна проводитися ретельна стерилізація виробничого обладнання та комунікації, поживного середовища. Культивування *C. tetani* відбувається глибинним способом. Також, під час культивування повинні бути створені безкисневі умови. Для цього потрібно подавати інертний газ або азот для витіснення повітря. [28]

Біосинтез тетанотоксину проводять періодичним способом, адже синтез токсину відбувається у стаціонарній фазі росту продуцента. Тому використання безперервного способу є недоцільним, оскільки буде спостерігатися значне зниження синтезу токсину. [29]

Узагальнюючи вищенаведене, культивування *C. tetani* Harvard 49205 – продуцента тетанотоксину – здійснюється за допомогою періодичного способу культивування за анаеробних умов з дотриманням асептики проведення процесу.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Палько Л. О.</i>					25	53
<i>Керівник</i>		<i>Скрацька О. І.</i>				25 <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В. П.</i>						

Так як наш біологічний агент є анаеробом, ферментер повинен бути оснащений барботером для подачі азоту.

Для забезпечення сталості температури ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури. Оскільки культивування має проводитися в асептичних умовах, ферментер має бути герметичним, а лінії трубопроводів мають витримувати стерилізацію паром і працювати за надмірного тиску.

Для інтенсифікації масообмінних процесів і кращої гомогенізації культуральної рідини потрібен перемішувальний пристрій. Для культивування продуценту не є обов'язковим перемішувальний пристрій певної будови, тому його можна обрати довільно. Обираємо лопатеву мішалку, як найбільш поширену.[30]

Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

Для підтримання оптимального значення рН має бути передбачено приготування титрувального агента (NaOH). Оптимальне рН для культивування становить $7,5 \pm 1$. В ході процесу ферментації можливе зниження даного показнику через виділення побічних продуктів (органічних кислот), в зв'язку з чим необхідний стабілізуючий розчин з лужними властивостями. [15]

4.1.2 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Оскільки обраний біологічний агент є облигатним анаеробом, система подавання аераційного повітря та піногасника в апарат не потрібна.

Лабораторне вирощування анаеробів на поживному агарі в чашках Петрі або в пробірках ведуть в анаеростатах. Анаеростати - це вакуумні металеві або скляні ексикатори, які добре зберігають високе розрідження протягом тривалого часу. Металевий анаеростат являє собою циліндр із щільною герметично закритою кришкою. На кришці встановлені манометр і кран, за допомогою якого прилад приєднують до насоса. Для росту строгих анаеробів засіяні чашки або пробірки встановлюють усередині анаеростату й знижують

тиск до 0,0001 МПа. Потім кран перекривають й анаеростат поміщають у термостат або термокамеру.[31]

Вирощування анаеробів в промислових масштабах реалізується подаванням азоту, суміші газів (азот + вуглекислий газ) або інертних газів, що дозволяють витіснити кисень. Окрім цього існують спеціалізовані біореактори, що не мають системи подавання повітря або інших газів.[32]

4.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

На промислових підприємствах, мікробіологічна безпека продукції, що виробляється, залежить від дотримання санітарних норм і правил, зокрема очистка та дезінфекція. Санітарна обробка виробничих приміщень, обладнання і інвентарю є невід'ємною складовою технологічного процесу і здійснюється за принципами системи аналізу небезпечних факторів та контролю у критичних точках (НАССР).[33]

Виробництво тетанотоксину *Clostridium tetani* Harvard 49205 проводиться протягом 100 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 10 л, лабораторне устаткування для підготовки компонентів поживного середовища та допоміжних розчинів, анаеростат.

З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня, тобто 100 разів. Також, раз на місяць здійснюється генеральне прибирання, тобто 3 рази. Кількість виробничих циклів для синтезу тетанотоксину становить 9. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 10, що включає миття після останнього циклу.

Щоб обрати мийний та дезінфікуювальний засіб потрібно враховувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого мийного чи дезінфікуювального засобу (згідно з методичними вказівками щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Окрім цього, важливим чинником при виборі дезінфікувальних засобів є наявність спородидних властивостей, що обумовлено характеристиками обраного біологічного об'єкта та відсутність вираженого токсичного впливу на людину. Для санітарної обробки об'єктів підприємства допускається застосування дезінфікуючих та миючих з дезінфікуючим ефектом засобів, які в установленому порядку внесені в “Обліковий перелік дезінфекційних засобів в Україні”, з метою миття або дезінфекції об'єктів фармацевтичної промисловості.

Біомой – багатокомпонентний, поліфункціональний, миючий засіб з дезінфікуючим ефектом (ТУ У 22902465.005-96). Основна діюча речовина – алкілбензосульфونات натрія.

Препарат являє собою сипучий порошок білого або світло-жовтого тону, допускається присутність пофарбованих ензимних включень. Добре розчинний у воді (розчинність не менше 30 г/дм³). Водні розчини Біомою безбарвні, не пошкоджують вироби з металу, скла, полімерних матеріалів, гуми та комбінованих матеріалів. Мають виражені емульгуючі та миючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Препарат не сумісний з катіонними ПАР.

Біомой належить до класу до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) при потраплянні у шлунок та до мало небезпечних речовин (4 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) при потраплянні на шкіру. У концентраціях рекомендованих до застосування не подразнює слизову оболонку очей. Для приготування робочого розчину Біомою використовується концентрація 0,15-0,5%. Робочий розчин Біомою готують у тарі будь-якого матеріалу шляхом розчинення у питній воді. Робочий розчин Біомою зберігають впродовж 1 доби, за умови щільно закритої тари – 14 днів. Використовується для обладнання та поверхонь.[34]

Дезактин – дезінфікуючий засіб, з широким спектром антимікробної дії (ТУ У 20.2-22920528-017:2013). Основна діюча речовина – дихлорантин.

Препарат є порошком від білого до жовтуватого кольору, зі слабким запахом хлору. Водні розчини Дезактину безбарвні та не пошкоджують вироби з металу, скла, дерева, кафелю, гуми та комбінованих матеріалів. Не фіксує білкові забруднення на поверхнях і добре змивається, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Препарат не сумісний з катіонними ПАР.

Дезактин належить до класу до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) при потраплянні у шлунок та до мало небезпечних речовин (4 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) при потраплянні на шкіру. В сухому та концентрованому вигляді має подразнювальну дію, при робочих розчинах цей ефект зникає. Не має мутагенних властивостей. Характеризується широким спектром антимікробної дії, в тому числі до більшості патогенів, збудників інфекцій, має спороцидну дію. Для приготування робочого розчину Дезактину використовується концентрація 0,5-2,5%. Робочий розчин готують у тарі будь-якого матеріалу, крім оцинкованого заліза, шляхом розчинення у питній воді. Зберігається робочий розчин протягом 3-х днів у щільно закритій тарі. Використовується для обладнання.[35]

Пероксин – рідкий концентрований мийно-дезінфікуючий засіб. Основна діюча речовина – пероксид водню та полігексаметиленгуанідин гідрохлорид. Володіє вираженими мийними властивостями, характеризується широким спектром антимікробної дії, має спороцидну дію, екологічно чистий та біодеградабельний. Робочі розчини не мають запаху та не спричиняють подразнювальної дії. Не пошкоджують вироби зі скла, дерева, кафелю, гуми та комбінованих матеріалів, виявляє помірні корозійні властивості. Не фіксує білкові забруднення на поверхнях, добре змивається, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Робоча концентрація розчину 1%. Робочий розчин готують у тарі будь-якого матеріалу, крім оцинкованого заліза, шляхом розчинення у питній воді. Зберігається робочий розчин протягом 14 днів у щільно закритій тарі. Використовується для поверхонь.[36]

Септофан – рідкий концентрований дезінфекційний засіб (ТУ У 24.2-34426212-004:2010). Основна діюча речовина – ЧАС.

Засіб являє собою прозору рідину, або з жовтуватим відтінком чи кольором барвника, зі слабким хімічним запахом. Допускається випадання осаду, що не впливає на стабільність дезінфікуючих властивостей засобу. Змішується з водою у будь-якому співвідношенні. Робочі розчини проявляють миючі та дезінфікуючі властивості, видаляють механічні, жирові та білкові забруднення. Засіб та його робочі розчини не спричиняють корозійної та іншої пошкоджувальної дії на матеріали об'єктів обробки - метали, полімери, скло, гуму, дерево, кахель, фаянс тощо, поверхні приладів та устаткування із лакофарбним, гальванічним, полімерним та ін. покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні об'єктів обробки, добре змиваються, не залишають нальоту. Не сумісний з милами та аніонними поверхневоактивними речовинами, не займистий, вибухобезпечний, екологічно деградабельний. Має широкий антимікробний ефект, володіє спороцидними властивостями.

Належить до класу до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) при потраплянні у шлунок та до мало небезпечних речовин (4 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) при потраплянні на шкіру. Робочі розчини мають слабковиражену подразнюючу дію на слизову оболонку очей. Для приготування робочого розчину Септофану використовується концентрація 0,1-5%. Робочий розчин Септофану готують у тарі будь-якого матеріалу шляхом розчинення у питній воді. Робочий розчин зберігається впродовж 4 тижнів, за умови щільно закритої тари. Використовується для поверхонь.[37]

4.1.4 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Особливістю технології культивування обраного біологічного агента є використання складних багатокомпонентних середовищ для вирощування, а також необхідність забезпечення чітких анаеробних умов культивування. З огляду на фізіологічні потреби *S. tetani* у вегетативній формі є вимогливими

мікроорганізмами і потребують додаткових факторів росту. Ці бактерії мають потребу у амінокислотах, пептидах, ферумі для хорошого росту.[19]

Максимальний синтез тетанотоксину (98 лф/мл за 168 год) досягається за умов росту штаму *Clostridium tetani* Harvard 49205 на середовищі такого складу (г/л):

- Гідролізат соєвого білка – 35;
- Глюкоза – 7;
- Цистеїн – 0,125;
- Тирозин – 0,125;
- NaCl – 5;
- Na₂HPO₄ – 0,5;
- KH₂PO₄ – 0,175;
- MgSO₄·7H₂O – 0,5;
- Залізний порошок – 0,5;[38]

Згідно розрахунків, наведених у розділі 1, виробничий біосинтез тетанотоксину здійснюють у ферментері об'ємом 10 л, що містить 7 л середовища. Одержання інокуляту проходить у 1 етап – лабораторне вирощування.

Приготування і стерилізація поживного середовища. На першому етапі, для вирощування посівного матеріалу потрібно 640 мл поживного середовища.

Тому для стерилізації компонентів обираємо автоклав Tuttnauer D-line 2840 ELV-D-1311-02167 з вертикальним завантаженням та робочим об'ємом камери 31 л. [39] Потрібні об'єми поживного середовища дозволяють проводити стерилізацію середовища як для вирощування інокуляту так і для виробничого біосинтезу у обраному автоклаві.

Для проведення стерилізації потрібно розділити поживне середовище на композиції, оскільки воно має термостабільні та термолабільні компоненти, які не можна разом стерилізувати. Дане середовище має такі термолабільні

компоненти, як гідролізат соєвого білка, глюкозу, цистеїн, тирозин. Окрім цього, у складі присутні магнієві та фосфорні солі, що не стерилізуються разом з причини утворення нерозчинних осадів при температурі стерилізації. Глюкоза готується у вигляді 40% розчину та у такому вигляді вноситься у середовище. Проаналізувавши склад обраного середовища, поділимо його на композиції для стерилізації:

Композиція А: глюкоза (у вигляді 40% розчину; режим стерилізації 112°C протягом 30 хвилин, тиск 0,05 МПа).

Композиція Б: гідролізат соєвого білка, цистеїн, тирозин (режим стерилізації 112°C протягом 30 хвилин, тиск 0,05 МПа).

Композиція В: натрій хлорид, гептагідрат сульфату магнію, залізний порошок (режим стерилізації 131 °С протягом 40 хвилин, тиск 0,15 МПа).

Композиція Г: гідрофосфат натрію, дигідрофосфат калію (режим стерилізації 131 °С протягом 40 хвилин, тиск 0,15 МПа).

Для виробничого ферментера об'єм поживного середовища становить 6,36 л. Таку кількість середовища можна простерилізувати в автоклаві, з поділом на композиції, як описано вище.

РОЗДІЛ 5

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
Кб-1	Колба для приготування титрувального розчину	1	Колби (Бунзена) з нижнім відводом. Матеріал – термостійке скло. Виробник: «Stylab».[1]
Кб-2 Кб-3 Кб-4 Кб-5 Кб-12	Колби для приготування посівного матеріалу та складових ПС для інокуляту.	4	Матеріал – термостійке скло. Виробник SIMAX, Чехія. [2]
Кб-7 Кб-8 Кб-9 Кб-10	Колби для приготування складових ПС для біосинтезу	4	Колби (Бунзена) з нижнім відводом. Матеріал – термостійке скло. Виробник: «Stylab». [1]
А-6	Автоклав для стерилізації ПС	1	Автоклав D-line 2840 ELV-D-1311-02167 (Tuttnauer), з вертикальним завантаженням, робочий об'єм 31 л. [3]
Ан-13	Анаеростат для культивування інокуляту	1	Анаеростат ANS1 місткістю 5 л. Виробник: «Спектро Лаб», Україна [4]

<i>НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Палько Л. О.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Скрацька О. І.</i>			
<i>Н. контр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В. П.</i>			
<i>РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання</i>				
		<i>Літера</i>	<i>Аркцих</i>	<i>Аркцив</i>
			<i>33</i>	<i>33</i>
<i>Кафедра БТМ</i>				

ФО-14 ФО-15	Фільтри індивідуальної очистки	2	Фільтр патронного типу ФПІ-4, ступінь чистоти 99,9%. Виробник: «Фолтер». [5]
Н-16	Перистальтичний насос для подачі титрувального розчину в ферментер	1	Перистальтичний насос-дозатор Seko Basic Pr. Продуктивність до 0,15 л/год. [6]
Ф-17	Ферментер для виробничого культивування.	1	Ферментер BIOSTAT D-DCU об'ємом 10 л. Виробник: «Sartorius Stedim Systems», Німеччина [7]
Н-18	Насос перистальтичний для відведення культуральної рідини	1	Перистальтичний насос-дозатор В 1201. Продуктивність 12 л/год. [8]

Посилання на джерела:

1. https://stylab-shop.com/category/konicheskie_kolbyi_264.html.
2. <https://mankor.ua/ru/labware/flasks.html> .
3. https://chemtest.com.ua/avtoklav_d_line_2840_elv.
4. <https://spectrolab.com.ua/ua/p1215985561-anaerostat-laboratornyj-ans.html>.
5. <https://folter.com.ua/catalog/fpi>.
6. <https://aquavital.com.ua/ua/p720009557-peristalticheskij-nasos-dozator.html>.

7. <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D>.
8. https://www.etatron.com.ua/ru/pumps/peristaltic_pumps/b-per/.

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ БІОСИНТЕЗУ ПРАВЦЕВОГО ТОКСИНУ

Технологічна схема біосинтезу правцевого токсину включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування розчинів титрувальних агентів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез тетанотоксину на основі бактерій *Clostridium tetani* Harvard 49205).

Технологічну та апаратурну схему біосинтезу тетанотоксину наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Приготування та стерилізація 6 % розчину NaOH для підлужнення поживних середовищ

Для підтримання оптимального рН на рівні 7,5 необхідно приготувати 50 мл 6% розчину NaOH. Зі складу беруть сухий NaOH, який являє собою білі, непрозорі кристали. Для приготування 1 л 6% розчину NaOH необхідно 0,06 кг сухого натрій гідроксиду, тоді для приготування 50 мл необхідно 3 г сухого натрій гідроксиду. На технічних вагах зважують 3 г NaOH і вносять у колбу КБ-1 об'ємом 100 мл, доливають до відповідної мітки дистильованою водою. Після змішування колбу закривають ватномарлевою пробкою та стерилізують в автоклаві А-6 при 131⁰С, 0,15 МПа упродовж 40 хв. Приготований розчин надходить на стадію ТП 5.1.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах.

Для вирощування інокуляту необхідно 640 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 640 мл середовища наведено в *табл. 4.1.*

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми процесу біосинтезу правцевого токсину</i>		
<i>Розробник</i>	<i>Палько Л. О.</i>						
<i>Керівник</i>	<i>Скороцька О. І.</i>						
<i>Н. контр</i>							
<i>Консульт</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В. П.</i>				<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
						36	353
					<i>Кафедра БТМ</i>		

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 640 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 640 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	7	4,5	А	11
Вода	-	7		
Гідролізат соєвого білку	35	22,4	Б	500
Цистеїн	0,125	0,09		
Тирозин	0,125	0,09		
Вода	-	475		
NaCl	5	3,2	В	80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,32		
Залізний порошок	0,5	0,32		
Вода	-	80		
Na ₂ HPO ₄	0,5	0,32	Г	50
KH ₂ PO ₄	0,175	0,11		
Вода	-	50		

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 4,5 г глюкози. Наважку переносять у колбу Кб-2 об'ємом 20 мл і додають піпеткою Мора на 10 мл 7 мл питної води.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві А-6 при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв.

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 22,4 г гідролізату сої. На торсійних терезах - 0,09 г. цистеїну і таку ж кількість тирозину. Наважку переносять у колбу Кб-3 об'ємом 1 л, додають питної води до мітки 500 мл, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві А-6 при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв.

ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 3,2 г NaCl, 0,32 г MgSO₄·7H₂O і 0,32 г залізного порошку. Наважку поміщають у колбу Кб-4 об'ємом 100 мл, додають 80 мл питної води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві А-6 при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 60 хв.

ДР 2.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 0,32 г Na₂HPO₄ та 0,11 г KH₂PO₄. Наважку переносять у колбу Кб-5 об'ємом 100 мл, додають 50 мл питної води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві А-6 при температурі 131 °С, тиск 0,15 МПа упродовж 60 хв.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури у ферментері об'ємом 10 л

Для виробничого біосинтезу необхідно приготувати 6,36 л поживного середовища, з врахуванням рідкого посівного матеріалу (10% від загального об'єму середовища).

Для приготування поживного середовища використовуємо питну воду. Вміст компонентів наведений в табл. 4.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6,36 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6,36 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	7	44,5	А	110
Вода	-	66		
Гідролізат соєвого білку	35	222,6	Б	3000
Цистеїн	0,125	0,8		
Тирозин	0,125	0,8		
Вода	-	2776		
NaCl	5	32	В	2000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	3,2		
Залізний порошок	0,5	3,2		
Вода	-	2000		
Na ₂ HPO ₄	0,5	3,2	Г	1250
KH ₂ PO ₄	0,175	1,1		
Вода	-	1250		

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 44,5 г глюкози. Наважку переносять у колбу з нижнім відводом КБ-7 об'ємом 200 мл, додають 66 мл питної води мірним стаканом, перемішують, закривають і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 0,05 МПА, протягом 30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 222,6 г гідролізату сої, 0,8 г цистеїну і тирозину. Наважку розділяють на дві рівні частини і переносять у дві колби з нижнім відводом Кб-8 об'ємом 2 л, додають питної води до мітки 1,5 л. у кожному з колб, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві А-6 при температурі 112 °С, 0,05 МПа, протягом 30 хв.

ДР 2.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 32 г NaCl, 3,2 г MgSO₄·7H₂O, 3,2 г залізного порошку. Наважку переносять у плоскодонну колбу з нижнім відводом Кб-9 об'ємом 3 л, додають 2000 мл питної води, перемішують та закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві А-6 при температурі 131 °С, тиск 0,15 МПа упродовж 60 хв.

ДР 2.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 3,2 г Na₂HPO₄ та 1,1 г KH₂PO₄. Поміщають наважку у колбу з нижнім відводом Кб-10 об'ємом 2 л, додають 1250 мл питної води, перемішують та закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві А-6 при температурі 131 °С, тиск 0,15 МПа упродовж 60 хв.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Культуру мікроорганізму *S. tetani* Harvard 49205 зберігають у ліофілізованому стані у флаконах при 4-8 °С, у темному місці. Всі роботи з культурою проводяться в строго асептичних умовах, в боксі біологічної безпеки.

ТП 3.2. Одержання робочої культури

Для відновлення культури використовують фізіологічний розчин хлориду натрію, додаючи 1 мл розчину до флакону. Розведену у фізіологічному розчині культуру в асептичних умовах пересівають в пробірки із тіогліколевим середовищем, після чого пересівають петлею агаризоване тіогліколеве

середовище до ізольованих колоній. Інкубуємо в анаеростаті при температурі 35 °С 48 годин.

ТП 3.3. Вирощування культури в колбі

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять 11 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1.), вносять 500 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2.), 80 мл розчину композиції В (від ДР 3.1.3.), 50 мл розчину композиції Г (від ДР 3.1.4.), та перемішують.

В стерильних умовах вносять посівну культуру (від ТП 3.2.). Бактерії вирощують у колбі, підтримуючи анаеробні умови за допомогою анаеростату упродовж 24 годин при температурі 35 °С.

Періодично (кожні 8 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП.4. Виробничий біосинтез

ТП.4.1 Виробничий біосинтез у ферментері 10 л

У попередньо простерилізований ферментер у асептичних умовах вносять 110 мл композиції А, 3000 мл композиції Б, 2000 мл композиції В та 1250 мл композиції Г. В процесі культивування проводять контроль рН, його підтримують на рівні $7,5 \pm 1$, шляхом додавання натрій гідроксиду (від ДР 1.), рівень рН $7,5 \pm 1$ контролюється на рН-метрі, після чого, в асептичних умовах, вносять підготовлений посівний матеріал (від ТП3.3.), в обсязі 10% у ферментер. На стадії виробничого культивування проводиться контроль температури, яка має становити 35 ± 1 °С. Щоб забезпечити підтримку оптимальної температури підводиться теплоносій у вигляді гарячої води, за необхідністю. Перемішуючий пристрій працює 25-50 об/хв, що є достатнім для масообмінних процесів в анаеробній культурі. Щоб забезпечити анаеробні умові культивування, у ферментер подають азот високого класу чистоти. Тривалість культивування штаму *C. tetani* становить 168 годин. Це є одним з основних показників закінчення процесу культивування, крім цього показником є прогнозована концентрація тетанотоксину, зниження показників рН.

Періодично проводиться відбір проб для мікробіологічного контролю (кожні 24-48 год), показників росту та визначення концентрації тетанотоксину (починаючи від 5 дня культивування).

Після культивування культуральна рідина подається за допомогою труби перетискування до збірника культуральної рідини.

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється мікроскопіюванням дослідного зразку та розсівом на чашки Петрі чи у пробірки. Якщо при мікроскопіюванні спостерігаються тільки грам-позитивні палички це свідчить про відсутність контамінації. Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х. *C. tetani* Harvard 49205 – грампозитивна паличкоподібна бактерія, розмір клітин лежить у межах 4-8x0,3-0,8 мкм. Рухома, джгутики розміщуються по всій поверхні клітини. За несприятливих зовнішніх умов утворює спори круглої форми, що розташовуються термінально. Діаметр спори перевищує поперечний розмір вегетативної клітини, тому клітини зі спорами мають форму так званої «барабанної палички».[40]



Рис 7.1. *Clostridium tetani* Harvard форма вегетативних клітин та спор, збільшення в x40[17]

					НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	Літера	Аркцш	Аркцшів
Розробник	Палько Л. О.						43	43
Керівник	Скороцька О. І.					Кафедра БТМ		
Н. кантр								
Консульт								
Зав. каф.	Стадніков В. П.							

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) - для виявлення дріжджів і грибів. Прямий висів: стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл з об'єма проби культуральної рідини і наносять її на поверхню відповідного поживного середовища, що знаходиться в чашці Петрі. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір та поміщають у анаеростат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА. При рості біологічного агенту на МПА розвиваються прозорі колонії білого або ледь кремового кольору, плівкової форми.[41]

7.2 Концентрація біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною культуральної рідини (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. Виміри проводилися при 660 нм на спектрофотометрі «Turner model 330». Для дослідження використовували скляні кювети з довжиною оптичного шляху $l = 1$ см. Як контроль використовувалася проба неінокульованого середовища. [42]

7.3 Концентрація тетанотоксину

Визначення концентрації правцевого токсину здійснюється за допомогою методу флокуляції по Рамону. Він використовується в біологічних дослідженнях та характеризується високою точністю.

Цей метод базується на тому, що при змішуванні сталої кількості токсину (анатоксину) зі зростаючої кількістю антитоксину (сироватки) рядом проб відбувається реакція преципітації з утворенням нерозчинного комплексу. Цей комплекс виявляється у вигляді помутніння вмісту проби та утворення пластівців(флокуляту). 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. Титр токсину чи анатоксину виражається у одиницях флокуляції на 1 мл (лф/мл або од. фл/мл). Особливістю визначення тетанотоксину є те, що час, який витрачений на приготування сумішей не повинен довго тривати, адже в гіршому випадку результати будуть неоднозначними. Також, отримані результати залежать від походження антитоксину та токсину, їхньої чистоти. Сигналом, що всі ці показники якісні та добре підібрані є те, що у ряді проб, флокуляція відбувається тільки в одній, в точці еквівалентності. [43]

Опис проведення:

З культуральної рідини відбирають пробу об'ємом в 12 мл. та поміщають в центрифужну пробірку об'ємом 15 мл. Пробірку центрифугують впродовж 30 хв., при 3400 обертах та температурі 4° С. У пробірки, що містять від 0,1 до 0,6 мл. стандартного правцевого антитоксину додають аліквоти супернатанту об'ємом 1 мл. кожна. Пробірки акуратно струшують для перемішування та поміщають на водяну баню (температура – 45° С) та реєструють час. Пробірки постійно перевіряють та відмічають час початку флокуляції. Пробу, у якій відбулася ініційна (перша) флокуляція позначають як LfFF, а пробу, у якій флокуляція відбулася другою за часом – LfF. [44] Розрахунок концентрації проводиться наступним чином:

$$LfFF > LfF : Lftoxin/ml = LfFF - (LfFF - LfF)/4$$

$$LfFF < LfF : Lftoxin/ml = LfFF + (LfF - LfFF)/4$$

За потребою, проводять повторний тест, вагомо зменшуючи різницю концентрацій антитоксину, наближуючи їх до значень еквівалентної точки, для більш точного результату. [45]

Показник lf (лф) є корисним допоміжним показником якості антигена. Якщо при сталих значеннях температури та концентрацій анатоксину і

антитоксину, цей показник змінюється при повторних дослідженнях, це свідчить про зниження імуногенної активності. [46]

7.4 Концентрація джерела Карбону і Нітрогену

7.4.1. Визначення амінного азоту

Джерелом азоту у середовищі для культивування *S. tetani* Harvard 49205 є гідролізат соєвого білку. Вміст азоту визначають формольним методом.[47] Так як цільовим продуктом є екзотоксин, тобто речовина білкової природи, яка буде впливати на результат, проби на визначення кількості амінного азоту у гідролізаті сої відбираються до початку виділення токсину.

Метод формольного титрування полягає у блокуванні формальдегідом при рН 7.0 аміногруп і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично.

Проведення:

Попередня підготовка досліджуваної проби: пробірки з культуральною рідиною об'ємом 25 мл центрифугують напротязі 30 хв., при 3400 обертах для відділення біомаси.

В хім. стакан об'ємом 50 мл. наливають 20 мл. досліджуваної проби. Електроди потенціометра поміщають у досліджуваний розчин, рН якого доводять до 7.0 р-на натрію гідроксиду (0,1 моль/л) чи соляної к-ти (0,1 моль/л). До нейтралізованої проби додають 2 мл. формаліну, перемішують і, не виймаючи електроди, титрують вміст р-ном натрію гідроксиду (0,1 моль/л) до рН 9,1. Проводять два паралельні виміри.

Вміст амінного азоту (X) у відсотках розраховують:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{A \cdot 1000}$$

A - об'єм досліджуваної проби, мл;

V- к-ть р-ну натрій гідроксиду, що витратився на титрування, мл;

K – поправка до титру р-ну натрій гідроксиду (0,1 моль/л);

1,4 – к-ть амінного азоту в міліграмах, що еквівалентне до 1 мл. р-ну натрій гідроксиду;

100, 1000 – коефіцієнти перерахунку. [48]

7.4.2. Визначення глюкози

Визначення глюкози у пробі культуральної рідини проводилося ферментним методом (глюкозооксидаза/пероксидаза) за допомогою та специфічного набору для визначення глюкози, за допомогою якого можливий кількісний аналіз вмісту глюкози у багатоконпонентних водних розчинах.[49] Суть визначення глюкози полягає у реакції глюкози з глюкозооксидазою в результаті якої утворюється еквімолярна кількість перекису водню. Під дією пероксидази перекис водню окислює хромогенні субстрати з утворенням кольорової сполуки, інтенсивність якої пропорційна кількості наявної глюкози в розчині (виз. при $\lambda = 415$ нм).

Протокол проведення дослідів визначення глюкози:

1. Відібрану пробу культуральної рідини 2 мл центрифугують у центрифужній пробірці при 3400 обертах протягом 30 хв. Супернатант об'ємом 0,2 мл відбирають та продовжують дослідження.
2. Окремо в дві пробірки додають дистильовану воду (контроль), в іншу – досліджувану пробу. Об'єм речовини для кожної пробірки складає 0,2 мл.
3. Додають 0,8 мл натрій-фосфатного буферу (рН 7) до пробірок.
4. Потім в кожен з пробірок додати 9,2 мл ферментно-хромогенної суміші (глюкозооксидази – 0,4 мл (100 ОД/мл); розчину 2,2-азино-біс-(3-

етилбензтіозолін-6-сульфо кислоти) діамонієвої солі (АБТС) – 8,4 мл (1 ммоль/л); пероксидази – 0,4 мл (20 ОД/мл) .

5. Струсити, залишити на 20 хв при температурі 37 °С..
6. Аналізували калібрувальну та робочу пробу проти контрольної проби на спектрофотометрі при довжині хвилі 415 нм в кюветі, з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Розрахунок концентрації глюкози проводили калібрувальним графіком.

Загальна тривалість дослідження становить приблизно 40 хв. [50]

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології: Підручник. - К.: Либідь, 2001. - 312 с.
2. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. / под ред. В.В. Зверев, Б.Ф. Семенов, Р.М. 2011. – 880 с.
3. Голубовська О. А. Інфекційні хвороби : підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів/ 2-е вид., Київ : Медицина , 2018. - 686 с.
4. Правець – гинуть дорослі та діти. Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://surskolitovska-gromada.gov.ua/1-13-16-19-08-11-2017/>.
5. Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001, 354(1381):259-268
6. 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.
7. Куценко А. Основи токсикології. - М.: Фоліант, 2004. — 570 с.
8. Супотницький М.В. Бактериальні токсини. Их природа, механізми действия, возможности конструирования гибридных и модифицированных токсинов // *Биопрепараты.* 2011; № 1. 6-15.
9. Рябоконт О. В. Інфекційні хвороби : навч. посіб. для студентів мед. ф-ту за спеціальністю 7.110.10 - "Стоматологія". - Запоріжжя : [ЗДМУ], 2011. – 205 с.
10. Cook T.M., Protheroe R.T., Handel J.M. Tetanus: a review of the literature // *Brit J of Anaesthesia.* — 2001. — Vol. 87, № 3. — P. 477-487.
11. Міністерство охорони здоров'я України. «Про вдосконалення профілактики, діагностики та лікування правця». Наказ МОЗ України від 05.08.1999 р. № 198. Доступно: <http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=776>

					НУХТ БТЕК 04.01.32 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	Літера	Аркцш	Аркцшів
Розробник		Палько Л. О.					49	53
Керівник		Скороцька О. І.						49
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стадніков В. П.						

12. АКДП-Біолік вакцина – інструкція, застосування, аналоги препарату. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.unian.ua/health/pharm/a/330-akds-biolek-vakcina-instrukciya-primeneniye-analogi-preparata>.
13. Barney S. Graham, Donna M. Ambrosino. History of passive antibody administration for prevention and treatment of infectious diseases. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2015, 10, 129-134
14. Vargas, P. & Gutiérrez, Ivonne & Garzón, E. & Moreno, Nubia & Poutou-Piñales, Raúl. Influence of sodium glutamate, bubbling N₂-gas and superficial aeration on tetanus toxin production in *Clostridium tetani* cultures. *Universitas Scientiarum*. 2005,10. 79-86.
15. Chawla, Anil & Das, Chandrani & Singh, Paramdeep & Tiwari, Mansha & Chaudhary, Seema. Production of tetanus toxin by using media substantially free from meat and blood. *AJPCR*. 2016, 9. 284-287.
16. Fratelli F, Siquini T. J, Prado S. M, Higashi H. G, Converti A, Carvalho J. C. Effect of medium composition on the production of tetanus toxin by *Clostridium tetani*. *Biotechnol Prog*. 2005, 56-61.
17. Valgaeren, Bonnie & De Schutter, Peter & Pardon, Bart & Eeckhaut, Venessa & Boyen, Filip & Immerseel, Filip & deprez, Piet. Thermic dehorning and ear tagging as atypical portals of entry of *Clostridium tetani* in ruminants.. *Vlaams Diergeneeskundig*. – 2011, 80.
18. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: М: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2002. – 736 с.
19. Morphological and culture characteristics of *Clostridium tetani*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://paramedicsworld.com/clostridium-tetani/morphology-culture-characteristics-of-clostridium-tetani/medical-paramedical-studynotes>.
20. Martha H. Roper, Steven G.F. Wassilak, Tejpratap S.P. Tiwari, Walter A. Orenstein. Tetanus toxoid. *Vaccines*. – 2013, 746-772.

21. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.
22. Голубовська О. А. Інфекційні хвороби : підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів/ 2-е вид., Київ : Медицина , 2018. - 686 с.
23. Про удосконалення проведення профілактичних щеплень в Україні: наказ Міністерства охорони здоров'я України від 11.08.2014 № 551.
24. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/>
25. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%EF%F0%E0%E2%F6%E5%E2%E8%E9%20%E0>
26. Наказ МОЗ України № 198 від 05.08.99 «Про вдосконалення профілактики, діагностики лікування правця».
27. Випадок гострого правця у дитини в Чернівецькій області / Л.О. Безруков, Ю.Б. Яценко, Л.В. Яценко, Ю.В. Щасливий // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 165-167.
28. Roper H., Wassilak G., Tiwari S. P., Orenstein A. Tetanus toxoid. *Vaccines*. – 2013, 746-772.
29. Chapeton-Montes D. Plourde L. Deneve C. Garnier D. Barbirato F. Colombié V. Demay S. Haustant G, Gorgette O, Schmitt C, Thouvenot C. Tetanus Toxin Synthesis is Under the Control of A Complex Network of Regulatory Genes in *Clostridium tetani*. *Toxins*. 2020; 12(5):328.
30. Ратушняк Г., Джеджула В., Анохіна К. Енергозберігаючі відновлювальні джерела теплопостачання. ВНТУ. 2010. 170 с.
31. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни „Загальна біотехнологія” для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія/ Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю. – Кам'янське, ДДТУ, 2019.–35 с.

32. Біореактор. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1929/bioreaktor>.
33. Дезінфекція та стерилізація. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/press/dezinfekciya-i-sterilizaciya-profilaktika-infekcij-v-medicine.html>.
34. Біомой. Інструкція. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dezmed.com.ua/ru/instruktsiia/item/biemoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruksiya-po-primeneniyu/>.
35. Дезактин. Інструкція до застосування. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dezmed.com.ua/ru/instruktsiia/item/dezaktin-metodicheskie-rekomendatsii-instruksiya-po-primeneniyu/>.
36. Пероксин. Інструкція до застосування. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dezmed.com.ua/ru/store/universalnye-preparaty-pso-dezinfekciya-sterilizaciya/peroksin/>.
37. Інструкція із застосування засобу «Септофан». [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://clean-ua.com.ua/content/files/metodichn-vkazvki-63536648.pdf>.
38. Demain AL, George S, Kole M, Gerson DF, Fang A. Tetanus toxin production in soy-based medium: Nutritional studies and scale-up into small fermentors. *Lett Appl Microbiol* 2007;45(6):635-8
39. Лабораторний автоклав вертикальний Tuttnauer 2840 ELV D-Line. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://masterdent.com.ua/catalog/oborudovanie/sterilizatsionnoe-oborudovanie/gospitalnye-i-laboratornye-avtoklavy/laboratornyy-avtoklav-vertikalnyy-tuttnauer-2840-elv-d-line/>.
40. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр “Академия”, 2006. – 464 с.

41. *Clostridium tetani*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.antimicrobe.org/b100.asp#:~:text=Clostridium%20tetani>.
42. Demain, A. L., Gerson, D. F., Kole, M., & Fang, A. The role of reduced iron powder in the fermentative production of tetanus toxin. *Applied Microbiol. and Biotechnol*, 2006, 73(1), 55–59.
43. Van Ramshorst, J. D., Rijks H. The flocculation of tetanus toxin and toxoid. *I. Antonie van Leeuwenhoek*, 1974. 20(1), 17–32.
44. 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.
45. Ravetkar, S. D., Rahalkar, S. B., Kulkarni, C. G. Large Scale Processing of Tetanus Toxin from Fermentation Broth. *J. Sci. Ind. Res.* 2001, 60, 773–778.
46. Burgstaller, D., Krepper, W., Haas, J., Maszelin, M., Mohoric, J., Pajnic, K. Satzer, P. Continuous cell flocculation for recombinant antibody harvesting. *Journal of Chemical Technology & Biotechnol.*, 2017, 93(7), 1881–1890.
47. Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Сравнительная оценка потенциальных белковых основ микробиологических сред // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014. №3.
48. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.
49. Measure glucose concentration in growth media. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.researchgate.net/post/How_can_I_measure_glucose_concentration_consumption_in_ecoli_growth_media.
50. Schneebeli R, Egli T. A defined, glucose-limited mineral medium for the cultivation of *Listeria* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(8):2503-2511.