

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**  
(повна назва інституту/факультету)

**Кафедра промислової біотехнології**  
(повна назва кафедри)

**Дипломний проект**

**на здобуття ступеня бакалавра**

з напрямку підготовки 6.051401 Біотехнологія  
(код і назва)

на тему: Технологія виробництва дифтерійного анатоксину.  
Дільниця біосинтезу

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

Краснокутська Світлана Андріївна  
(прізвище, ім'я, по батькові) \_\_\_\_\_ (підпис)

Керівник доц., к.б.н. Орябінська Лариса Борисівна  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)

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

Рецензент доц., к.т.н. Саблій Л.А.  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)

Київ – 2016 року

Дифтерія - це гостра, антропонозна, повітряно-крапельна, токсинемічна інфекція, що спричиняється небезпечним отруйним токсином, який виділяють токсигенні штами *Corynebacterium diphtheriae*.

Хвороба вражає верхні дихальні шляхи, кон'юктиви, рани, викликаючи гостре запалення та ураження серцево-судинної та нервової систем.

Неповна первинна імунізація, велика кількість відмов і безпідставних протипоказань до щеплень, фальсифікація щеплень у дітей та відсутність планової ревакцинації дорослого населення стають причиною виникнення спалахів захворювання на дифтерію в різних регіонах України.

Найбільш небезпечно, з виникненням важких ускладнень чи навіть ризиком летального результату, хвороба протікає у дітей, віком до п'яти років і дорослих, старших за сорок років. Це пов'язано з тим, що в останні роки спостерігається тенденція росту резистентності дифтерійного токсину до дії антибіотичних препаратів. Саме тому, найкращим є попередження захворювання за рахунок вакцинації.

Дифтерійний анатоксин очищений адсорбований (АД-М-анатоксин) є одним з найменш реактогенних препаратів, який можна використовувати для планових ревакцинацій, застосовувати разом з поліомієлітною вакциною та іншими препаратами національного календаря щеплень.

У зв'язку з тим, що захворюваність в Україні на дифтерію все ще залишається на досить високому рівні, виробництво дифтерійного анатоксину для імунізації та профілактики захворювання залишається актуальним до цього часу.

Тому метою дипломного проекту є розробка технології виробництва дифтерійного анатоксину.

Для її досягнення були поставлені наступні завдання:

1. Дати характеристику *Corynebacterium diphtheriae* *Paqke-Williams* 8 як продуцента дифтерійного токсину.
2. Провести аналіз біохімічних основ виробництва.

3. Розглянути основні методи отримання промислових штамів та запропонувати схему отримання високоімуногенного штаму.
4. Скласти технологічну і апаратурну схеми виробництва вакцини
5. Провести розрахунок та обрати конструкцію ферментера для проведення процесу біосинтезу.
6. Передбачити всі необхідні вимоги щодо охорони праці та охорони навколишнього середовища на виробництві вакцини.

В **першому** розділі була розглянута характеристика біологічного агенту та його основні особливості. *Corynebacterium diphtheriae* PW 8 - прямі або трохи зігнуті грампозитивні палички, у яких на кінцях є булавоподібні стовщення, особливістю яких є те, що вони при забарвленні розташовуються під кутом. В залежності від умов росту, може дисоціювати на R- та S-форми.

Для біовару *gravis* (важка форма дифтерії) характерна R-форма колоній, а для *mitis* (полегшена форма дифтерії) - S-форма.

Колонії *C. Diphtheriae* PW 8 *gravis*, які використовуються для виробництва дифтерійного токсину – крупні матові, випуклі в центрі з радіальною смугастістю та нерівними краями («маргаритки»).

Збудник дифтерії відноситься до факультативних анаеробів, культивується при 35 ° C, оптимум рН - 7,4-8,0. Є хемоорганогетеротрофом з окислювально-ферментативним метаболізмом.

Оптимальні середовища для культивування *C. diphtheriae* повинні містити амінокислоти (аланін, цистин, цистеїн, гліцин, триптофан, валін, лейцин, метіонін, пролін, глутамінову кислоту), органічні джерела енергії, джерела Mg ++, Cu ++, Ca ++, вітаміни, кров або сироватку.

Антигенна структура коринебактерій дуже гетерогенна і мозаїчна.

Середовищем існування для *C. diphtheriae* є люди, в зіві яких вони локалізуються. Зараження відбувається повітряно-крапельним, контактнo-побутовим (через м'які іграшки у дітей), аліментарним (частіше через молоко) способами.

У **другому** розділі висвітлені біохімічні основи виробництва кінцевого продукту. Готовий препарат представляє собою суспензію жовто-білого кольору, основною діючою речовиною якого є дифтерійний анатоксин. Допоміжними речовинами є гель алюмінію гідроксиду, тіомерсал, натрію хлорид та вода для ін'єкцій. Введення препарату викликає створення специфічного імунітету проти дифтерії.

У **третьому** розділі висвітлено методи отримання промислового продуценту. Синтез дифтерійного токсину мікробними клітинами детермінований спеціальним геном *tox*, що локалізуються в ДНК лізогенного фагу. Оскільки застосування індукованого мутагенезу до виробничого штаму може призвести до непередбачуваних генетичних змін у ньому, в тому числі, до припинення продукції дифтерійного токсину, у якості метода генетичного конструювання *in vivo* було обрано штучний добір без застосування мутагенних факторів. На його основі вибрано для виробництва колонії з найбільшою швидкістю росту та найкращою імуногенністю.

Технологічний процес починається з допоміжних робіт, до яких належать: санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, води, стерильних ампул та розчинів, а також приготування поживних середовищ.

Спочатку в колбах готують стерильні розчини 0,6% мальтози і 40% глюкози та стерилізують їх в автоклаві.

Потім готують сироваткове середовище Лефлера в колбах, стерилізують в автоклаві за тих самих умов та заливають у пробірки, які ставлять під нахилом. Музейну культуру засівають на пробірки з середовищем та ставлять в термостат для отримання відновленої культури.

Далі у змішувач завантажують компоненти середовища Лінгуда в визначеному порядку. Потім, через систему стерильних шлангів, додають приготований розчин мальтози. Середовище стерилізують гострою парою і охолоджують.

Приготованим середовищем заливають простерилізовані в автоклаві колби, засівають відновленою культурою, поміщають на шейкер для перемішування і інкубують для отримання інокуляту.

В ферментер завантажують рідке середовища Лінгуда, вносять інокулят *C. diphtheria* та піногасник через систему стерильних шлангів. Культивування проводять протягом 40 годин при температурі 35 °С при інтенсивній аерації та постійному перемішуванні. У разі підвищення рН до 8,2 і більше, у ферментер додають розчин глюкози.

Після завершення культивування мікробну суспензію подають до надцентрифуги для відділення токсину від мікробних клітин і, далі – на ультрафільтраційну установку. Фільтрат далі подається на установку стерилізуючої фільтрації. Далі в змішувачі готують стерильний розчин гексаметафосфату натрію та стерилізують гострою парою.

Для часткової детоксикації токсину отриманий на попередній стадії фільтрат, інкубують протягом 5 діб . Для осадження додають три хлороцтову кислоту та приготований гексаметафосфат натрію. Розчин з осадженим токсином центрифугують. Отриманий осад у змішувачі піддають очистці активованим вугіллям і гідроксидом алюмінію з додаванням борно-боратного буферного розчину і далі – подають на ультрафільтраційну установку, а потім – на установку стерилізуючої фільтрації.

Після цього стерильний фільтрат заливають у реактор-детоксикатор, додають формалін і інкубують протягом 15-20 діб. За цей час токсин повністю переходить в форму анатоксину, який далі піддається ультрафільтрації. Потім готують фізіологічний розчин та стерилізують гострою парою.

Адсорбування анатоксину проводять в змішувачі, у який подають гель гідроокису алюмінію, додають очищений дифтерійний анатоксин та залишають при періодичному перемішуванні. Після цього додають стерильний фізіологічний розчин та консервант мертиолят натрію. Суміш перемішують і охолоджують.

Далі проводять контроль препарату, і, за умови відповідності всім показникам, передають на розлив, пакування та маркування препарату.

Оскільки метою роботи була розробка дільниці біосинтезу, то нами було проведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки ферментеру об'ємом  $0,05 \text{ м}^3$  з лопатевою мішалкою, та барботером та сорочкою, роль теплоносія в якій відіграє вода.

Апарат забезпечує ряд вимог:

- стала температура проведення процесу -  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
- необхідна інтенсивність перемішування - 120 об/хв;
- необхідна аерація  $30 \text{ м}^3/\text{год}$ ;
- забезпечення герметичності апарату та асептичних умов.

Отже, можна зробити висновки:

1. В якості продуцента дифтерійного токсину обрано штам *Corynebacterium diphtheriae* *Ragke-Williams* 8 і наведено його морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні та серологічні ознаки, описано його поширення в природі.
2. Представлено генетичну вивченість *C. diphtheriae* PW8 і наведено блок-схему отримання високоімуногенного промислового продуценту.
3. Проведено аналіз біохімічних основ виробництва, в ході якого надано характеристику дифтерійного анатоксину і компонентного складу готового препарату.
4. Запропоновані методи очистки дифтерійного анатоксину і розглянуті механізми його впливу на біохімічні процеси.
5. Складено матеріальний баланс дільниці біосинтезу, створено технологічну і апаратурну схеми виробництва дифтерійного анатоксину.
6. Проведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки ферментеру об'ємом  $0,05 \text{ м}^3$  з лопатевою мішалкою, сорочкою та барботером. Наведено креслення загального виду обраного апарату.
7. Передбачені заходи щодо створення здорових і безпечних умов праці та охорони навколишнього середовища при виробництві препарату.