

**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 правцевого анатоксину.

Дільниця біосинтезу

Виконала: студентка 4 курсу, групи БТ-21
(шифр групи)

Пітроченко Інеса Миколаївна
(прізвище, ім'я, по батькові) _____ (підпис)

Керівник доц., д.б.н. Галкін Олександр Юрійович
(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 проф., д.т.н. Саблій Л.А.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Київ – 2016 року

Не зважаючи на вік активної імунізації правцева інфекція в Україні і сьогодні залишається актуальною медичною та соціальною проблемою, оскільки займає за летальністю четверте місце після СНІДу, сказу та мієлоїдозу. За останні 5 років летальність від правця в Україні перевищує 60%.

Основним методом запобігання правцю є імунізація з використанням протиправцевих вакцин. Основним діючим компонентом протиправцевої вакцини є правцевий анатоксин, очищений від баластних речовин та адсорбований на гідроокисі алюмінію. Єдиним продуцентом токсину є бактерії *Clostridium tetani*. Організм потребує складних середовищ і строго анаеробних умов культивування. Робота дослідників нині полягає в пошуку нових високпродуктивних штамів, які б не потребували тривалого культивування на дорогих середовищах.

Актуальність дипломного проекту полягає в тому, що у ньому представлений процес виробництва правцевого анатоксину. Адже в Україні на даний час не зареєстровано жодної вітчизняної вакцини проти правцю, ні в самостійному, ні в асоційованому вигляді.

Метою дипломного проекту є: розроблення процесу виробництва правцевого анатоксину та проектування обладнання для проведення промислового культивування.

Завдання для дипломного проекту:

1. Підібрати та охарактеризувати промисловий продуцент правцевого токсину. Провести аналіз методів створення високопродуктивного промислового штаму-продуценту та навести схему його отримання.
2. Навести характеристику кінцевого продукту виробництва та розглянути біохімічні основи виробництва правцевого анатоксину.
3. Підібрати оптимальні умови та склад живильного середовища для проведення процесу біосинтезу.
4. Спроекувати конструкцію ферментеру, яка буде задовольняти параметрам проведення процесу.
5. Навести технологічну та апаратурну схеми для виробництва правцевого анатоксину. Скласти матеріальний баланс стадії біосинтезу.

Збудником правцю є бактерія роду *Clostridium* – *Clostridium tetani*. *C. tetani* – палички розміром 4-8×0,4-1 мкм із закругленими кінцями. Рухливі. Містять 20 джгутиків і більше, що розташовуються перитрихіально. Спороутворюючий мікроорганізм. Спори круглі, рідше овальні, розміщені термінально. Їх діаметр в 2-3 рази перевищує товщину бактерій, внаслідок чого вони нагадують «тенісні ракетки» або «барабанні палички». Спори стійкі до хімічних і фізичних дій; вони виживають впродовж 8-10 год. в 1% розчині сулеми і 5% розчині фенолу, а також витримують кип'ятіння впродовж 0,5-1 год. Капсул не утворюють. Грампозитивні.

На щільних поживних середовищах виростають колонії сіруватого кольору, іноді прозорі з нерівною зернистою поверхнею і витягнутими кінцями – R-форма. У високому стовпчику агару *C. tetani* утворюють колонії у вигляді пушинок, іноді колонії бувають темні і нагадують сочевичні зерна. На кров'яних середовищах навколо колоній відзначається зона гемолізу. При посіві збудників правця на середовище Кітт-Тароцці середовище мутніє. Зростання на середовищі Вільсона-Блера характеризується почорнінням середовища

Збудник правця – строгий анаероб. Високочутливий до кисню. Спеціальними середовищами для їх вирощування слугують: середовище Вейнберга в модифікації ЦЕМ, середовище Вілліса і Хоббса, середовище Кітт-Тароцці та ін. Збудники правця ростуть при температурі 35-37 ° С і рН середовища 6,8-7,4. Посіви на чашках ставлять в анаеростатах.

Клостридії мають 2 типи антигенів: соматичні антигени (О-антигени) і термолабільні джгутикові антигени (Н-антигени) утворені білком флагеліном. Відомо 10 сероварів *C. tetani*. Поділ на серовари здійснений за антигенними особливостями джгутиків. Втім, це не має практичного значення, так як всі різновиди *C. tetani* виробляють ідентичний нейротоксин, що забезпечує єдність патогенезу і уніфікацію імунопрофілактики.

Збудники правця широко поширені в природі. *C. tetani* знаходиться в основному в теплих, вологих районах, особливо в гної, яким обробляють ґрунт.

В даній технології для виробництва анатоксину було вибрано штам *Clostridium tetani* Копенгаген 471. Також для виробництва використовують штами Колле №154, Лондонський №228. Обраний штам має високу імуногенну активність, володіє стабільними морфологічними та культурально-біохімічними властивостями. Для виробництва правцевого анатоксину запропоновано цілий ряд поживних середовищ: напівсинтетичне казеїнове середовище, казеїново-рослинне, казеїново-рибне, м'ясо-казеїнове і поживні середовища з м'яса.

Існує залежність між силою правцевого токсину і хімічним складом використовуваного середовища. Встановлено, що токсини, більш високої сили, можна отримати на середовищах, що містять великі кількості малорозщеплених білків і мають низький амінопептидний коефіцієнт. В якості середовища для накопичення правцевого токсину у ферментері було обрано казеїново-рослинне кислотнo-гiдролiзне середовище

Компонентний склад даної готового анатоксину наступний: очищений правцевий анатоксин не менше 40 МО, адсорбований на алюмінію гідроксиді не більше 1 мг/доза;

допоміжні речовини: натрію хлорид, натрію гідрогенфосфат додекагідрат, калію дигідрофосфат, вода для ін'єкцій.

У якості інактиванта і консерванта в даній технології запропоновано формальдегід.

Оскільки завданням даного проекту була розробка дільниці біосинтезу було підібрано і спроектовано ферментер для накопичення правцевого токсину в культуральній рідині. До ферментеру висувається ряд вимог для створення оптимальних умов росту бактеріальної культури:

- підтримання певного значення рН;
- забезпечення аерації та інтенсивне диспергування повітря;
- відвід тепла, що виділяється в процесі ферментації;
- забезпечення стерильності.

Обраний ферментер об'ємом 1 м³ задовольняє поставлені умови. Ферментер оснащений сорочкою з холодним теплоносієм, в якості якого обрано воду. Сорочка має штуцери для вводу і виводу теплоносія. Апарат оснащений установкою для термометра, заміром тиску, датчиком рН-метра. Враховуючи тепловий розрахунок ферментеру середовище не вимагає ні обігріву, ні охолодження. За режиму роботи ферментеру при температурі 35°C теплоносій в сорочку не подається. Проте в виробничому процесі є необхідність використання ферментеру з сорочкою для стерилізації ферментеру, а також для охолодження поживного середовища після стерилізації. Також в ферментер подається азот для забезпечення анаеробних умов в процесі біосинтезу. Проведений розрахунок підтверджує надійність обраної конструкції та забезпечення відповідного контролю параметрів. Також було підібрано апаратурну та технологічну схеми лінії виробництва правцевого анатоксину, що враховують особливості технології даного виробництва та включають параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу. Враховуючи те, що продуцент є збудником захворювання на правець, що є патогенним для людини, необхідно дотримуватися особливих природоохоронних заходів, а також умов роботи персоналу з патогенними мікроорганізмами. Обов'язковим і необхідним є проведення мікробіологічного моніторингу виробничого середовища, основна мета якого – гарантія стабільності асептичних умов виробництва, виявлення відхилень і вироблення коригувальних дій у разі виявлення нестерильної (невідповідною) продукції та загрози для здоров'я персоналу. Проект виконується з урахуванням вимог охорони праці, пожежобезпеки та екологічної безпеки. На основі аналізу шкідливих та небезпечних виробничих факторів нами передбачено заходи і засоби щодо створення на даному підприємстві безпечних умов праці та пожежної безпеки.

Висновки

1. В наведеному дипломному проекті розглянуто виробництво адсорбованого правцевого анатоксину, що викликає формування специфічного антитоксичного протиправцевого імунітету.
2. В якості продуцента обрано штам *Clostridium tetani* 471 Копенгаген. Цей продуцент володіє високою продуктивністю і росте на дешевших порівняно з іншими продуцентами середовищах. Продуцент отриманий методом штучного добору.
3. Обрано оптимальні умови для проведення процесу біосинтезу правцевого токсину, а саме: температура процесу біосинтезу 35°C, тривалість культивування 120 год на казеїново-рослинному середовищі за умов пропускання через нього азоту.
4. Наведено технологічну схему, в якій описані стадії допоміжних робіт й стадії основного технологічного процесу, та апаратурну схему виробництва, а також матеріальний баланс стадії біосинтезу.
5. Обґрунтовано конструкцію ферментеру та виконано розрахунок ферментеру для промислового культивування *Clostridium tetani* з номінальним об'ємом 1м³. Апарат оснащений лопатевою мішалкою.