НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кафедра біотехнології і мікробіології

КУРСОВА РОБОТА

з дисципліни «Технологія мікробного синтезу лікарських засобів»

на тему: «Культивування Clostridium tetani для одержання правцевого анатоксину»

Студентки 3 курсу 3 групи

напряму підготовки 6.051401

«Біотехнологія»

Расулової Є.Р.

Керівник:

доц., к.т.н.

Красінько В.О.

Київ 2015

РЕФЕРАТ

Курсова робота присвячена розробленню технологічної схеми біосинтезу правцевого анатоксину з використанням бактерії Clostridium tetani.

В ході роботи було обґрунтовано:

) вибір біологічного агенту, штам бактерії C.tetani Копенгаген 471, який дає змогу отримати більшу концетрацію тетаноспазміну в порівнянні з іншими штамами, які використовуються у виробництві (Колле 154, 473, тощо).

) вибір поживного середовища, а саме казеїново-рослинного, яке дозволить бактерії C.tetani Копенгаген 471 продукувать концентрацію тетаноспазміну до 26 ОЗ/мл. Наведено склад поживного середовища для культивування даного мікроорганізму. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації його компонентів.

) вибір ферментаційного обладнання з урахуванням того, що проводиться культивування анаеробного патогенного мікроорганізму.

Технологічна схема біосинтезу анатоксину C.tetani Копенгаген 471 включає допоміжні роботи (приготування та стерилізація титрувальних агентів, а також підготовка і стерилізація поживного середовища) та власне технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез).

Курсова робота складається із вступу, п’яти розділів, списку використаної літератури та технологічної схеми (1 аркуш формату А-3). Загальний обсяг роботи - 34 сторінки, 5 таблиць та 3 рисунки.

Ключові слова: Clostridium tetani, правцевий токсин, казеїново-рослинне середовище

ЗМІСТ

культивування фермент правцевий токсин

РЕФЕРАТ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1. Опис цільового продукту

РОЗДІЛ 2. Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

РОЗДІЛ 3. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера для отримання правцевого токсину

РОЗДІЛ 4. Технологічна схема процесу біосинтезу правцевого анатоксину

РОЗДІЛ 5. Контроль виробництва правцевого токсину

.1 Мікробіологічний контроль

.2 Контроль показників росту і синтезу

.2.1 Визначення концентрації біомаси

.2.2 Визначення концентрації цільового продукту

.2.3 Визначення концетрації амінного азоту

.2.4 Визначення вмісту вуглеводів

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ГРАФІЧНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Вакцінологія вивчає методи штучного створення несприйнятливості до інфекційних агентів і принципи розробки нових вакцинних препаратів.

Вакцина (лат. vacca - корова) - препарат, що складається з ослаблених, вбитих збудників хвороб чи продуктів їхньої життєдіяльності. Ці специфічні речовини дістали назву від противіспяного препарату, виготовленого з вірусу коров'ячої віспи. Метод щеплень за допомогою вакцин називають вакцинацією, або імунізацією [1].

Творцем наукової теорії запобігання інфекційним захворюванням за допомогою виготовлених в лабораторії вакцин був засновник медичної мікробіології Луї Пастер. Вперше вакцинацію було здійснено в 1796 році англійським лікарем Едвардом Дженнером, який штучно прищепив дитині коров'ячу віспу, в результаті чого ця дитина набула імунітету до натуральної віспи [1].

Сьогодні, вакцинація населення в нашій державі є регулярною та частково обов’язковою. Оскільки, існують хвороби, яких можна уникнути лише завдяки попередній вакцинації, наприклад, коклюш, туберкульоз, поліомеліт та правець, то звичайно вакцинологія швидко розвивається та є необхідною для сьогодення.

Сучасні вакцини поділяють на чотири групи:

· вакцини, які виготовляють із живих збудників з ослабленою вірулентністю

· вакцини з убитих патогенних мікробів

· анатоксини (виготовляються з екзотоксинів відповідних збудників обробкою їх 0,3-0,4%-м розчином формаліну і витримуванням при температурі 38-40 °С протягом 3-4 тижнів). Добуті у такий спосіб дифтерійний, правцевий, стафілококовий, холерний та інші анатоксини знайшли широке застосування в практиці;

· хімічні вакцини (їх виготовляють не з цілих бактеріальних клітин, а із хімічних комплексів, добутих шляхом обробки суспензії клітин спеціальними методами; наприклад, для профілактики черевного тифу і правця застосовують хімічну сорбовану вакцину з О- і Vi- антигенів черевнотифозних бактерій і очищеного концентрованого правцевого анатоксину).

Багато мікроорганізмів, що викликають захворювання в людини, небезпечні тим, що виділяють екзотоксини, що є основними патогенетичними факторами захворювання (наприклад, дифтерія, правець).

Правець - це інфекційне захворювання <http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%86%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9%D0%BD%D0%B5\_%D0%B7%D0%B0%D1%85%D0%B2%D0%BE%D1%80%D1%8E%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F>, що уражає нервову систему, викликає тонічні і тетанічні судоми <http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%83%D0%B4%D0%BE%D0%BC%D0%B8> скелетних м'язових волокон, що ведуть до асфіксії <http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D1%81%D1%84%D1%96%D0%BA%D1%81%D1%96%D1%8F>. Збудником захворювання є анаеробна спороутворююча паличка Clostridium tetani <http://uk.wikipedia.org/wiki/Clostridium\_tetani> [2].

Він може бути викликаний після будь-яких травм з пошкодженням шкірних <http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A8%D0%BA%D1%96%D1%80%D0%B0> покривів та слизових оболонок, забруднених спорами збудника. Він може проникнути в організм людини через дрібні, частіше - колоті рани, при побутових і сільськогосподарських травмах, особливо нижніх кінцівок.

Захворювання може розвинутись при укусах, опіках, відмороженнях, у породіль при порушенні асептики, у новонароджених при забрудненні пупкової рани. У зовнішнє середовище паличка потрапляє з випорожненнями людини і тварин. Першим запідозрив інфекційне походження правця М. І. Пирогов <http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%BE%D0%B2>. в 1884 році.

Бактерія C.tetani <http://uk.wikipedia.org/wiki/Clostridium\_tetani>, небезпечна тим, що потрапляючи до організму людини вона починає виділяти екзотоксини, що є основними патогенетичними факторами захворювання.

В якості вакцини використовують анатоксини, вони індукують специфічну імунну відповідь. Для їх одержання, екзотоксини відповідного збудника знешкоджують за допомогою формаліну і витримують при температурі 38-40 ˚С. Добуті у такий спосіб анатоксини знайшли широке застосування в практиці [2].

Актуальність теми:

Правець є дуже розповсюдженою та небезпечною хворобою, яка призводить до летальних випадків, тому виникає гостра необхідність вакцинації населення. Якщо раніше мікробіологи намагалися уникнути побічних проявів від вакцинації, то сьогодні, перед дослідниками поставлена дещо інша задача. По-перше необхідно продовжувати пошук та культивування нових штамів бактерії C.tetani <http://uk.wikipedia.org/wiki/Clostridium\_tetani>, які дозволять зменшити кількість годин культивування та підвищать кількість отримання тетаноспазміну.

Новизною є:

Використання високотоксиноутворювального штаму C. tetani <http://uk.wikipedia.org/wiki/Clostridium\_tetani> Копенгаген 471, що має продуктивність до 26 ОЗ/мл, в порівнянні з іншими штамами, які використовуються у виробництві [6].

Новим технологічним рішенням, прийнятим у ході проектування, є використання ферментеру марки CelliGen BLU [12], який має змінні пластикові стерильні посудини одноразового використання, що з огляду на високу патогенність біологічного агенту є доцільним.

РОЗДІЛ 1. Опис цільового продукту

Правцевий анатоксин входить до складу вакцини проти правця та АКДП-вакцини, або випускається як самостійний лікарський засіб. Вони, так само, як і всі вакцини широко використовуються в медицині, а саме для планової імунізації населення, з метою уникнення захворювання.

Анатоксин - це токсин певного виду мікроорганізму, знешкоджений шляхом спеціальної обробки при збереженні здатності викликати імунітет <http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%86%D0%BC%D1%83%D0%BD%D1%96%D1%82%D0%B5%D1%82>.

Анатоксин правцевий - це препарат, отриманий у результаті дії формаліну на правцевий токсин за певних умов [3].

Правцевий токсин являє собою білок, який не міцно зв'язаний зі стромою бактеріальної клітини. Процес утворення токсину (тетаноспазміну) в культурі знаходиться в прямій залежності від наявності в поживному середовищі пептидів, які містять гістидин. Вважають, що ці пептиди індукують у правцевих паличок синтез особливої протеази, яка приймає участь або в активації тетаноспазміну або в його відщепленні від субклітинних мембранних структур.

Молекулярна масса тетаноспазміну знаходиться в межах 141-160 кДа. Токсичний білок термолабільний і після 20-25 хвилин прогріву при 60-62°C втрачає активність [4].

Токсин складається із двох субодиниць з молекулярними массами 53 і 107 кДа. При дисоціації обидва фрагмента втрачають токсичні властивості. В культуральній рідині виявляється окрім тетанозпазміну ще один компонент - тетанолізин з молекулярною массою приблизно 60 кДа.

Тетаноспазмін діє на периферичну нервову систему і викликає тонічні скорочення поперечносмугастої мускулатури. Тетанолізін викликає лізіс еритроцитів. Тетаноспазмін нейтралізується протиправцевою сивороткою, нестійкий при нагріванні, в лужному середовищі і під дією сонячних променів. Не всмоктується в травній системі, безпечний при пероральному прийомі [4].

Міжнародне найменування

Анатоксин правцевий (Tetanus Antitoxin)

Групова приналежність

МІБП-анатоксин

Фармакологічна группа

Вакцини, сироватки, фаги і анатоксини.

Склад і форма випуску

Одна прищеплювальна доза (0,5 мл) препарату містить 10 одиниць зв'язування (ОЗ) правцевого анатоксину. Сорбент - гідроксид алюмінію (0,25-0,55 мг / мл), консервант - мертиолят (0,05 мг / мл). Ампули по 1 мл (дві прищепні дози), в упаковці 10 шт.

Характеристика

АП-анатоксин складається з очищеного правцевого анатоксину, адсорбованого на гелі гідроксиду алюмінію. Препарат являє собою суспензію жовтувато-білого кольору, яка розділяється коли стоїть на прозору надосадову рідину і пухкий осад, повністю змішується при струшуванні.

Діючі речовини (МНН)

Анатоксин правцевий.

Лікарська форма

Суспензія для підшкірного введення.

Фармакологічна дія

Викликає формування специфічного антитоксичного імунітету проти правця.

Показання

Активна імунізація проти правця, екстрена специфічна профілактика правця.

Протипоказання

Гіперчутливість, вагітність (планові щеплення), гострі захворювання і загострення хронічних захворювань.

Побічні дії

Рідко (у перші дві доби) - гіпертермія, нездужання, місцеві реакції (хворобливість, гіперемія, набряклість); в поодиноких випадках - алергічні реакції (ангіоневротичний набряк, кропив'янка, поліморфна висип), незначне загострення алергічних захворювань.

Спосіб застосування та дози

Підшкірно (глибоко) в підлопаткову область в разовій дозі 0,5 мл. Перед щепленням ампулу необхідно ретельно струсити до отримання гомогенної суспензії.

Активна імунізація

Повний курс вакцинації для осіб, які раніше були не щеплені проти правця, складається з двох щеплень з інтервалом 30-40 днів і ревакцинації через 6-12 міс. (як виняток допускається подовження інтервалу до 2-х років).

Наступні ревакцинації проводять кожні 10 років правцевим анатоксином зі стандартним або зменшеним вмістом антигенів одноразово. Імунізація деяких важко охоплених контингентів населення (літні люди, неорганізоване населення) з урахуванням специфічних умов в окремих місцевостях за рішенням Міністерства охорони здоров'я може бути проведена за скороченою схемою, що передбачає одноразове введення препарату в подвоєній дозі (1.0 мл) з першої ревакцинацією в період від 6 міс. до 2 років і наступними ревакцинаціями через кожні 10 років.

Термін придатності препарату

Термін придатності складає 1 рік. Не застосовувати після закінчення терміну придатності, зазначеного на упаковці.

Зберігання

У сухому, захищеному від світла місці, при температурі 4-10°C. Зберігати в недоступному для дітей місці. Заморожування сорбованого анатоксину не допускається, бо це веде до втрати імуногенних властивостей.

Препарат у розкритій ампулі зберіганню не підлягає. Не придатний до застосування препарат в ампулах з порушеною цілісністю, відсутністю маркування, при зміні фізичних властивостей (зміна кольору, наявність пластівців, що не розбиваються і сторонніх включень), неправильному зберіганні [5].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

У світі для отримання правцевого токсину використовують різні штами C. tetani. Ідентифіковано одинадцять штамів C.tetani, і усі вони виробляють нейротоксин, відомий як тетаноспазмін. Цей токсин здатний викликати хворобу правця. Так, в Україні, Росії та Німеччині для виробництва даного токсину використовують штам Колле 154, 473, Копенгаген 471, а в інших країнах використовується штам Гарвард. На активність токсину, головним чином, впливає вік посівного матеріалу [4].

Оскільки, бактерія C.tetani є єдиним збудником правця, доцільним буде провести характеристику на рівні штамів. Нині, найчастіше використовують штам Колле 154.

Було відмічено кращу активність токсину, при використанні старих культур, вік яких лежить в межах від 2 місяців і до трьох років. Робочі штами зберігають на поживних середовищах при 4-8°C. Архівні штами зберігаються в ліофілізованому стані, для попередження виникнення мутацій [4].

Вибір поживного середовища багато в чому залежить від використовуваного штаму бактерій, методів культивування, очищення та детоксикації. На території СНД для культивування використовується казеїново-рослинне середовище, так як в цих країнах використовується один штам правцевої культури і доволі близькі технологічні схеми отримання препаратів [4].

Для підтвердження актуальності використання у промисловості саме цього мікроорганізму в (табл. 2.1) було проведено порівняння між штамами Clostridium tetani Копенгаген 471 та Колле 154 [6,10].

Таблиця 2.1

Особливості одержання правцевого анатоксину за рахунок культивування С. tetani Копенгаген 471 та Колле 154

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Біологічний агент | Склад поживного середовища, г/л | Особливості технологічного процесу | Використана література |
|  |  | Концентрація цільового продукту, ОЗ/мл | Тривалість процесу, год | Температура культивування, °С | Рівень рН |  |
| C. tetani штам Копенгаген 471 | Середовище №1: Кислотний гідролізат казеїну (триптон), 2 Дріжджовий екстракт, 5 Гідролізат пшеничних висівок, 5 Калій дигідрофосфат, 0,45 Динатрій гідро фосфат, 5,34 | 22-26 | 168-216 | 34 | 6,8-7,2 | Некоторые механизмы формольной детоксикации столбнячего токсина/ Кашпур Н.В., Волянська Н.П., Чернявский В.И. - Опубл.2009 |
| C. tetani штам Колле 154 | Середовище №1: Казеїново-рослинне Кислотний гідролізат казеїну (триптон), 2 Дріжджовий екстракт, 5 Гідролізат пшеничних висівок, 5 Калій дигідрофосфат, 0,45 Динатрій гідро фосфат, 5,34 | 11-13 | 168-216 | 34 | 6,8-7,2 | Некоторые механизмы формольной детоксикации столбнячего токсина/ Кашпур Н.В., Волянська Н.П., Чернявский В.И. - Опубл.2009 |
| C. tetani штам Колле 154 | Середовище №2: Бикова печінка (декілька шматочків ≈150г) Глюкоза, 5 МПБ, 5 Пептон, 10 | 20 | 144 | 35 | 6,8-7,2 | Clostridium tetani Growth and Toxin Production in the Intestines of Germfree Rats/ Departments of Surgery and Medical Microbiology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin S3706 |

За результатами даної таблиці можна зробити висновок про те, що штам C. tetani Копенгаген 471 має більший потенціал для використання, ніж штам C. tetani Колле 154, бо на однаковому середовищі, за однакових умов культивування, ми маємо змогу спостерігати різну концентрацію цільового продукту.

Важливе значення при виборі продуцента має склад поживного середовища для його культивування. Саме тому перед початком виробництва будь-яких препаратів (в тому числі й правцевого анатоксину) необхідно проводити оптимізацію поживного середовища, намагатися досягнути якнайменшої вартості компонентів середовища, тощо. Адже економічний аспект на виробництві має визначальне значення як на собівартість продукту, так і на дохід від його реалізації.

Для культивування штамів C. tetani використовують стандартні загальновідомі поживні середовища, такі як: Кітта-Тароцци, кров’яний агар, Вільсона-Блера, Вілліса-Хоббса, а також казеїново-рослинні, напівсинтетичні казеїнові та м’ясо-казеїнові поживні середовища та інші. Найчастіше використовують казеїново-рослинне поживне середовище та Кітта-Тароцци [6]. Порівняння запропонованих штамів на цих поживних середовищах наводиться в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування С. tetani Копенгаген 471 та Колле 154

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Біологічний агент | Концентрація кожного компонента поживного середовища, г/л | Ціна компонентів поживного середовища, грн/кг | Вартість компонентів (грн) для приготування 1 л середовища | Джерело інформації (1,2,3) \* |
| C. tetani штам Копенгаген 471 | Середовище №1: (казеїново-рослинне) Кислотний гідролізат казеїну (триптон), 2 |  2387,46  | 4,8 |  1 |
|  | Гідролізат пшеничних висівок, 5 | 2 | 0,01 | 2 |
|  | Дріжджовий екстракт, 5 | 816 | 4,08 | 3 |
|  | Калій дигідрофосфат, 0,45 | 37,1 | 0,017 | 4 |
|  | Динатрій гідрофосфат, 5,34 | 32,4 | 0,17 | 5 |
|  | Вартість 1 л. середовища - 9,077 грн. |
| C. tetani штам Колле 154 | Середовище №1: (казеїново-рослинне) Кислотний гідролізат казеїну (триптон), 2 |  2387,46 | 4,8 |  1 |
|  | гідролізат пшеничних висівок, 5 | 2 | 0,01 | 2 |
|  | Дріжджовий екстракт, 5 | 816 | 4,08 | 3 |
|  | Калій дигідрофосфат, 0,45 | 37,1 | 0,017 | 4 |
|  | Динатрій гідрофосфат, 5.34 | 32,4 | 0,17 | 5 |
|  | Вартість 1 л. середовища - 9,077 грн. |
| C. tetani штам Колле 154 | Середовище №2: (Кітта-Тароцци) Бикова печінка (декілька шматочків ≈ 150 г) |  38,76 |  5,8 |  7 |
|  | Глюкоза, 5 | 264 | 1,32 | 3 |
|  | МПБ,5 | 1092 | 5,46 | 6 |
|  | Пептон,10 | 720 | 7,2 | 3 |
|  | Вартість 1 л. середовища - 19,78 грн. |

\*Примітка: Ціни наведено станом на березень 2015р. 1)http://germeon.kz/catalogue.php?vir=0&gid=003.070.011&rid=003.070.011.015,

) http://lipovec.flagma.ua/otrubi-pshenichnye-o1893931.html,

)http://www.farmaktiv.com.ua/index.php/ru/,

) http://russian.alibaba.com/product-gs/kh2po4-chemical-name-dipotassium-phosphate-1527169637.html,

)http://ru.made-in-china.com/co\_twellsansino/product\_DSP-Disodium-Hydrogen-Phosphate\_hoyeniruy.html ,

) http://www.starko.com.ua/price.htm ,

) http://odessa.flagma.ua/pechen-govyazhya-zhelovanaya-proizvodstva-usa-jbs-o2039276.html

За результатами даної таблиці можна зробити висновок, що вартість 1л середовища для культивування штамів С. tetani Копенгаген 471 та Колле 154 досить сильно відрізняється, більш ніж в 2 рази, проте концентрація цільового продукту на середовищі 1 та середовищі 2, майже не відрізняється. Отже, використовувати середовище 2 (Кітта-Тароцци) для культивування С. tetani Колле 154 немає необхідності.

Проте, остаточні висновки робити зарано, тому пропоную для детальнішого пошуку найдоцільнішого продуценту розрахувати умовну вартість 1мг цільового продукту для вищезгаданих штамів даного мікроорганізму (табл.2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мг цільового продукту (правцевого токсину) при культивуванні С. Tetani Колле 154 та Копенгаген 471

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Біологічний агент | Вартість 1л средовища, грн | Концентрація цільового продукту, ОЗ/мл | Умовна вартість цільового продукту, грн | Тривалість культивування, год | Концентрація цільового продукту, синтезованого за год, ОЗ/мл |
| C. tetani штам Копенгаген 471 | 9,077 | 22-26 | 0,37 | 168-216 | 0,13 |
| C.tetani штам Колле 154 | 1) 9,077 | 11-13 | 0,76 | 168-216 | 0,06 |
| C. tetani штам Колле 154 | 2) 19,78 | 20 | 0,99 | 144 | 0,14 |

Аналізуючи дану таблицю, можна зробити висновок про те, що перспективним штамом для виробництва правцевого анатоксину є штам Копенгаген 471, за рахунок високої біосинтетичної активності та одночасної дешевизни поживного середовища. Простота виготовлення казеїново-рослинного середовища, на якому вирощують даний мікроорганізм, зробить процес більш технологічним, за рахунок меншої кількості технологічних операцій. Єдиним недоліком цього штаму є дещо довший процес ферментації, що потребує більших затрат електроенергії та інших ресурсів.

Отже, можна зробити висновок про те, що необхідно й далі вдосконалювати технологію отримання анатоксину, шляхом збільшення продуктивності виділених штамів та зменшенні цін на використовувані поживні середовища.

РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ СПОСОБУ КУЛЬТИВУВАННЯ І ТИПУ ФЕРМЕНТЕРА ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПРАВЦЕВОГО ТОКСИНУ

По відношенню до кисню бактерія C. tetani є облігатним анаеробом, тому можливим методом культивування є глибинне культивування, відповідно, відпадає необхідність у підготовці аераційного повітря, проте необхідно подавати інертний газ, для витіснення повітря під час культивування. На щільних поживних середовищах - кров'яному і печінковому агарі - правцева паличка росте тільки при повному видаленні кисню, тому для культивування треба використовувати анаеростат (рис.3.1) [9].



Рис.3.1. Анаеростат на 15 чашок Петрі

Оптимальна температура росту 34-37 °С, отже, даний мікроорганізм є мезофілом.

Особливість культивування С.tetani є використання надзвичайно складних поживних середовищ, які вимагають великої кількості підготовчих робіт.

При виробництві правцевого токсину якість отриманого гідролізату казеїну визначає, як токсиноутворення, так і процес подальшого очищення. Необхідно враховувати, що кислотний гідроліз білкової сировини відбувається не тільки на стадії власне витримування реакційної суміші при заданій температурі, але і під час доведення її до даної температури, також при охолодженні отриманого гідролізату до температури, вказаної в технології. Так, при гідролізі казеїну 80% продуктів гідролізу накопичується на стадії нагрівання. Причому внесок стадій нагрівання та охолодження в даний процес зростає із збільшенням місткості апарату, що, природно, вимагає проведення валідації процесу при масштабуванні.

Для приготування гідролізата висівок використовують пшеничні висівки крупного помелу (вологість - 11-13%, крохмалю 23-30%), які поміщають в очищену воду в співвідношенні 1: 6, додають 1% хлороформу і для проведення гідролізата поміщають при 45°С на 15 годин при періодичному помішуванні. До 4 об'ємів казеїнового гідролізату додають 1 об'єм гідролізата висівок. Суміш розводять водою до амінного азоту - 130-150 мг, доводять до кипіння, додають 0,05% динатрій гідрофосфату і 0,05% дигідрофосфату калію, встановлюють pH 7,4-7,6 і кип'ятять ще 10 хв.

Середовище фільтрують і стерилізують при 110-112°С протягом 30 хв. Для збереження ростових властивостей поживного середовища можна використовувати метод мембранної фільтрації.

Концентрація пептону в середовищі становить 1,5-1,7%, амінного азоту 130-150 мг, що дозволяє забезпечити бактерії правця джерелом азоту, який необхідний культурі мікроорганізмів для життєдіяльності. До складу середовища в якості джерела вуглецю вводиться 0,5% глюкози (розчин вводиться в середовище стерильним), яка використовується мікроорганізмами як джерело енергії. Продукти гідролізата висівок і вітаміни використовуються як фактори росту, які необхідні мікроорганізмам в малих дозах для синтезу біологічно активних речовин, що регулюють внутрішньоклітинний метаболізм. Джерелом фосфорного харчування є додаються в середу фосфати калію і натрію. Неорганічні солі служать не тільки джерелом іонів, необхідних для нормального функціонування клітин C. tetani, а й виконують буферну функцію, нівелюючи великі зміни pH в процесі росту мікроорганізмів [4].

Підготовчі стадії будуть представленні підготовкою титруючих агентів: NH4OH (40%) та HCl (6%) для підтримання pH 7,4-7,6.

Специфіка полягає в тому, що культивується патогенно небезпечний мікроорганізм, спори стійкі до хімічних і фізичних дій, вони виживають протягом 8-10 год в 1 % розчині сулеми і 5 % розчині фенолу, а також витримують кип'ятіння протягом 0,5-1 год, тому це вимагає додаткових правил роботи з патогенними мікроорганізмами. Наприклад, персонал має бути захищеним (халат, маска, рукавички, захисні окуляри), робота повинна проводитися в спеціальних боксах або приміщеннях з обмеженою доступністю, не проводити піпетування ротом - використовувати відповідні механічні пристрої, а також інші відомі правила безпеки під час роботи з даним мікроорганізмом [11].

Для культивування даного мікроорганізму обираємо ферментер марки CelliGen BLU (рис.3.2), об’ємом на 5 л. Даний біореактор має змінні пластикові стерильні посудини одноразового використання із загальним обсягом 5 л і робочим об'ємом 1,25 - 3,75 л, магнітний привід (швидкість 25-200 об / хв.), можливість перемикання напрямку обертання для створення висхідного або низхідного потоку. Особливістю наведеного ферментеру є те, що використовуються одноразові посудини для культивування, це актуально в нашому випадку, бо культивується патогенний мікроорганізм [12].



Рис.3.2. Ферментер, для культивування С.tetani, з метою отримання правцевого токсину

Виробничий біосинтез здійснюємо у ферментері об’ємом 5 л з коефіцієнтом заповнення 0,8. Робочий об’єм ферментера (Vроб) визначаємо за формулою:

роб = Vг.ф Кзап ,

де Vг.ф - геометричний об’єм ферментера;

Кзап - коефіцієнт заповнення, 0,8.роб = 5  0,8 = 4 л.

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об’єму поживного середовища. Отже, для одержання 4 л культуральної рідини потрібно:роб.1 = 4 0,1 = 0,4 л посівного матеріалу.

Таку кількість інокуляту можна одержати в колбі на 500 мл. з використанням магнітного перемішуючого пристрою.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу правцевого токсину у ферментері об’ємом 5 л з коефіцієнтом заповнення 0,8 буде проходити в один етап - вирощування в колбах з використанням магнітного перемішуючого пристрою.

Оскільки кількість посівного матеріалу становить 10 % від об’єму поживного середовища, то кількість води, використовувана для приготування середовища буде дорівнювати Vводи = 4 - 0,4 = 3,8 л.

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

Композиція А - триптон, гідролізат висівок, дріжджовий екстракт (112°С, 30 хв. при Р=0,05 МПа)

Композиція Б - калій дигідрофосфат, динатрій гідрофосфат (131°С, 60 хв. при Р=0,15 МПа).

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА ПРОЦЕСУ БІОСИНТЕЗУ ПРАВЦЕВОГО ТОКСИНУ

Технологічна схема доферментаційних процесів та процесу біосинтезу правцевого токсину представлено у графічній частині роботи.

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

Креслення технологічної схеми представлене на 1 аркуші формату А3, де зображені допоміжні роботи та технологічний процес.

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ БІОСИНТЕЗУ ПРАВЦЕВОГО ТОКСИНУ

Проведення допоміжних робіт (ДР):

ДР 1. Приготування титруючих розчинів

ДР 1.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти

Для попередження реакцій залуження, а для підтримання оптимального рН при виробничому біосинтезі, у ферментер додають 6% розчин HCl з розрахунком 0,002 л на 1 л середовища. Таким чином, загальна потрібна кількість HCl:

ґ0,002 = 0,01 л = 10 мл

Такої кількості розчину сповна вистачить для контролю рН середовища при виробничому біосинтезі.

Для приготування 10 мл 6% р-ну соляної кислоти у колбі об’ємом 50 мл змішують ≈ 1,5 мл 38% соляної кислоти та ≈ 8,5 мл дистильованої води.

Готовий розчин не потребує стерилізації. Зберігається у тій же колбі.

ДР 1.2. Стерилізація 40%-го розчину гідроксиду амонію

Для підтримання оптимального рН на рівні 7,4-7,6 при виробничому біосинтезі, у ферментер додають 40% розчин NH4OH з розрахунком 0,002 л на 1 л середовища. Таким чином, загальна потрібна кількість NH4OH:

ґ0,002 = 0,01 л = 10 мл

Такої кількості розчину сповна вистачить для контролю рН середовища при виробничому біосинтезі.

Отже, 10 мл 40% NH4OH вносять у колбу на 50 мл, фільтрують через мембранний фільтр так, щоб фільтрат опинявся у стерильній колбі на 50 мл. Зберігають у ній же.

ДР 2. Підготовка та стерилізація поживного середовища

ДР 2.1. Приготування гідролізату висівок. Для отримання гідролізату висівок використовують пшеничні висівки крупного помелу (вологість - 11-13%, крохмалю 23-30%). Зважаючи на невеликі об’єми, готуємо одразу ж і для основного ферментаційного процесу (всього 22 г). Співвідношення кількості висівок до води - 1:6. Зважують 25 г пшеничних висівок на технічних вагах та переносять у колбу на 300 мл, заливають 132 мл дистильованої води. Додають у колбу 1,32 мл (1%) хлороформу, який в свою чергу буде попереджати появу контамінації та з часом випарується, закривають ватно-марлевою пробкою. Поміщають у термостат, який поміщений під витяжною шафою, витримують 15 год при 45 °С та періодичному помішуванні.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на магнітному перемішувачі

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 400 мл поживного середовища. Джерело вуглецю - гідролізат висівок, фактори росту - гідролізат висівок та вітаміни, що містяться у дріжджовому екстракті, джерело фосфору - фосфати калію та натрію. Вміст компонентів для приготування 400 мл середовища наведені в табл. 4.1

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 400 мл середовища

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компоненту на 400 мл середовища, г | Композиція | Об`єм композиції, мл |
| Кислотний гідролізат казеїну (триптон) | 2 | 0,8 | А  | 250 |
| Гідролізат висівок | 5 мл | 2 мл |  |  |
| Дріжджовий екстракт | 5 | 2 |  |  |
| Калій дигідрофосфат | 0,45 | 0,18 |  Б |  150 |
| Динатрій гідрофосфат | 5,34 | 2,14 |  |  |

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А. Зважують на технічних вагах 0,8 г триптону та 2 г дріжджового екстракту. За допомогою мірного циліндра на 10 мл відміряють 2 мл гідролізату висівок (від ДР 2.1). Переносять компоненти у колбу на 500 мл, заливають 250 мл дистильованої води. Кип’ятять 10 хв на водяній бані, щоб прибрати розчинений кисень в поживному середовищі. Далі суміш фільтрують крізь тканинний фільтр. Закривають ватно-марлевою пробкою.

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

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б. На технічних вагах зважують 0,2 г калій дигідрофосфату та 2,1 г динатрію гідрофосфату, Вносять у колбу на 300 мл, заливають 150 мл дистильованої води. (від ДР 1.1). Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

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

ДР 2.3. Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу.

При коефіцієнті заповнення 0,8 робочий об’єм становитиме 4 л.

Готуючи поживне середовище заданого об’єму необхідно врахувати, що додають 10% посівного матеріалу, відповдно, кількість води для приготування поживного середовища буде складати 3,6 л.

Для композиції А кількість води буде становити 2,2 л, а для композиції Б - 1,4 л.

Вміст компонентів для приготування поживного середовища виробничого біосинтезу наведений в табл. 4.2.

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А. Відміряють у мірному циліндрі 20 мл гідролізату висівок (від ДР 2.1). На технічних вагах зважують 8 г триптону та 20 г дріжджового екстракту. Переносять у колбу на 3 л, заливають 2 л дистильованої води, закривають ватно-марлевою пробкою. Кип’ятять 10 хв на водяній бані. Фільтрують через тканинний фільтр.

Стерилізують у автоклаві при 112 °С, 30 хв, тиск 0,05 МПа (до ТП 4.1).

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4 л середовища

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компоненту на 4 л середовища, г | Композиція | Об`єм композиції, л |
| Кислотний гідролізат казеїну (триптон) | 2 | 8 | А | 2,2 |
| Гідролізат висівок | 5 мл | 20 мл |  |  |
| Дріжджовий екстракт | 5 | 20 |  |  |
| Калій дигідрофосфат | 0,45 | 1,8 | Б | 1,4 |
| Динатрій гідрофосфат | 5,34 | 21,4 |  |  |

ДР 2.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б. На технічних вагах зважують 1,8 г калій дигідрофосфату та 21,4 г динатрію гідрофосфату, Вносять у колбу на 2 л, заливають 1,5 л дистильованої води. Для запобігання утворення осаду доводять рН середовища до значення 4,5-5,5 соляною кислотою (від ДР 1.1). Закривають колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізують у автоклаві при 131°С, 60 хв, за тиску 0,15 МПа (до ТП 4.1).

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру Clostridium tetani штам Копенгаген 471 зберігають у ліофілізованому стані при 4-8 °С.

ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованих поживних середовищах на чашка Петрі

Культуру клітин (від ТП 3.1) висівають штрихом на чашку Петрі із кров’яним або печінковим агаром до ізольваних колоній. Вирощують без доступу кисню в анаеростаті 24-28 год при 34 °С.

ТП 3.3. Вирощування культури у рідкому поживному середовищі у пробірках

Отримані ізольовані колонії на чашках Петрі (від ТП 3.2) в асептичних умовах пересівають петлею в пробірки із середовищем Кітта-Тароцци, у розрахунку одна ізольована колонія для засіву однієї пробірки. Вирощуємо упродовж 24 годин в анаеростаті, який поміщений в термостат за температури 34 оС.

ТП 3.4. Вирощування культури в колбі на магнітному перемішувачі

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбах на магнітному перемішувачі приготовлені та простерилізовані композиції А і Б (від ДР 2.2.1, ДР 2.2.2) асептично вносять у стерильну колбу на 500 мл. В стерильних умовах вносять посівну культуру (від ТП 3.3) Анаеробні умови у колбі забезпечуються великим коефіцієнтом заповнення. Колбу встановлюють на магнітному перемішувачі, вирощують 24 год при 34 оС, за повільного перемішування.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування

У одноразову ємкість ферментера вносять простерилізовані композиції А та Б (від ДР 2.3.1, ДР 2.3.2). рН середовища доводять до значення 7,4-7,6 за допомогою титрувальних розчинів (від ДР 1.1, ДР 1.2). Стерильно вносять інокулят (від ТП 3.4).

Виробничий біосинтез триває 168-216 год при температурі 34 оС, рН 7,4-7,6, при постійній подачі інертного газу.

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

РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПРАВЦЕВОГО ТОКСИНУ

Упродовж культивування періодично (кожних 8 години) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю і амінного азоту.

5.1 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) - для виявлення дріжджів і грибів.

Специфіка роботи з правцевим токсином полягає в небезпечності цього процесу, тому людина буде працювати за допомогою ламінарного бокса, який надасть спеціалісту повну безпеку під час роботи (рис. 5.1.1.) [13].



# Рис. 5.1.1. Ламінарний бокс "Ламинар-С"-"Protect"

Оскільки технологічний процесс повинен бути стерильним, то пробу культуральної рідини відбирають в строго асептичних умовах.

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, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою..tetani - велика (3-12 × 0,3-0,6 мікрон), рухома за допомогою кількох джгутиків (перитрих) паличкоподібна бактерія. Утворює овальні ендоспори, що перевищують діаметр клітини в 2-3 рази, розташовані термінально (характерна морфологія типу «барабанних паличок» (рис. 5.1.2.) [7].



Рис. 5.1.1. Clostridium tetani у світловому мікроскопі при збільшенні 90х

5.2 Контроль показників росту і синтезу

.2.1 Визначення концентрації біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

5.2.2 Визначення концентрації цільового продукту (правцевого токсину)

Підготовка проби: Необхідна проба виготовляються з тетаноспазміну, який піддається обробці 0,3-0,4%-м розчином формаліну і витримуванню при температурі 38-40 °С протягом 3-4 тижнів).

Визначення: Виходячи з передбачуваної активності, пробу розводять 0,9% розчином натрію хлориду до концентрації 0,1 МО/мл. Готують кілька розведень, що відрізняються за активністю одне від іншого на 10-20%.

По 1 мл кожного розведення сироватки переносять у флакони, додають по 2 мл 0,9% розчину натрію хлориду і 10 досліджуваних доз правцевого токсину в обсязі 1 мл. Отримані суміші обережно перемішують, уникаючи піноутворення, і після витримування при температурі (37 ± 1) ºС протягом (45 ± 1) хв вводять 4 білим мишам масою (17 ± 1) г під шкіру стегна в об'ємі 0,4 мл.

Дослід супроводжують контролем дослідної дози токсину, для чого готують суміш, що містить 1 мл стандартного зразка активності протиправцевої сироватки, розведеного до концентрації 0,1 МО / мл, 1 мл токсину, що містить 10 дослідних доз, і 2 мл 0,9% розчину натрію хлориду . Суміш інкубують при тих же умовах, що і випробувану сироватку і вводять її 4 білим мишам масою (17 ± 1) г під шкіру стегна в об'ємі 0,4 мл. За тваринами дослідної та контрольної груп спостерігають 4 доби, відзначаючи кількість загиблих від правця.

Специфічну активність (титр) сироватки розраховують, виходячи з найбільшого її розведення, яке в суміші з дослідною дозою токсину забезпечує захист 100% мишей від правця. Тест не враховують, якщо всі миші в контрольній групі залишилися живі без ознак правця.

Питома активність. Не менше 1000 МО на 0,1 г білка. Питому активність (Х) обчислюють за формулою:

X = T / (C × 10),

де:

Т - титр сироватки, МО / мл;

С - концентрація білка, г / мл;

- постійний коефіцієнт [11].

5.2.3 Визначення концентрації амінного азоту

Визначення проводять мідним способом. Суть даного методу полягає у тому, що визначається кількість амінокислот у певній кількості досліджуваного розчину, при додаванні фосфорнокислої міді у боратному буфері та відтитровуванні йоду розчином тіосульфату натрію. Визначається за різницею кількості розчину тіосульфату натрію витраченого на титрування дослідного зразка та контролю.

Техніка визначення:

мл супернатанту культуральної рідини наливають у мірну колбу на 25 мл і додають одну - дві краплі тимолфталеїну і по краплях 1 н. розчин гідроксиду натрію до блідо-синього забарвлення. Після цього у колбу додають 10 - 15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, потім доводять вміст колби до мітки дистилоьваню водою. Добре збовтують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифугують.

Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат.

- 10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу або у фарфорову чашку, додають 0,25 - 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 0,2 - 0,4 г калій йодиду. Йод, що виділився, відтитровують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1 - 4 краплі крохмалю до зникнення синього забарвлення. Параллельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного досліду беруть дистильовану воду.

Результат обчислюють за формулою:

Х = ,

де Х - вміст амінного азоту, мг/л; а - кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування дослідного зразка, мл; в - кількість 0,01н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування контролю,мл; n - кількість досліджуваного розчину, яку взято на аналіз, мл[15].

5.2.4 Визначення вмісту вуглеводів прискореним методом Шоорло

Метод Шоорло застосовують для аналізу розчинів редукуючи цукрів з низьким вмістом сахарози або якщо необхідно визначити загальний вміст цукрів у перерахунку на сахарозу.

Метод визначення :

У конічну колбу місткістю 50 см3 вносять піпеткою 3 см3 супернатанту культуральної рідини, додають піпеткою або бюреткою точно 1 см3 7%-го розчину сульфату міді (II) і 1 см3 лужного розчину сегнетової солі, протягом 2 хв доводять суміш до кипіння, кип'ятять рівно 2 хв, швидко охолоджують до кімнатної температури, додають 1 см3 30%-го розчину йодиду калію, 1см3 25%-ї сірчаної кислоти і відразу ж титрують 0,1 н. розчином тіосульфату натрію до світло-жовтого забарвлення. Потім додають 3-4 краплі 1%-го розчину крохмалю (індикатор) і продовжують титрування до зникнення синього забарвлення.

Проведення контрольного досліду: Аналогічно проводять контрольний дослід, в якому замість 3 см3 досліджуваного розчину беруть ту ж кількість дистильованої води.

Різниця між величинами, отриманими в контрольному досліді і при визначенні цукру в досліджуваному розчині, помножена на поправку до титру тіосульфату натрію, показує кількість відновленої міді, виражене в см3 точно 0,1 н. розчину тіосульфату натрію. Для перерахунку кількості 0,1 н. розчину тіосульфату натрію, що відповідає кількості відновленої міді, на цукор (мг сахарози) користуються такими коефіцієнтами, встановленими експериментальним шляхом: глюкоза - 3,3; фруктоза - 3,7; сахароза - 3,4; мальтоза - 5,4. Найбільш точні показники виходять у тому випадку, якщо різниця результатів титрування 0,1 н. розчином тіосульфату натрію в контрольному і основному дослідах знаходиться в межах 0,7-1,2 см3. При використанні витяжок з більш високим вмістом цукру для визначення беруть 1 см3 витяжки і додають 2 см3 дистильованої води [16].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології: Підручник. - К.: Либідь, 2001. - 312 с.

. Пяткин К.Д. Микробиология с вирусологией и иммунологией. - М.: «Медицина», 1971. - 243-246 с.

3. Фармацевтична енциклопедія: Анатоксин. [Електронний ресурс]: Режим доступу <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2779/anatoksin>

. Краснопольский Ю.М., Борщевская М. И. Биотехнология иммунологических препаратов - Харьков: Фармитэк, 2008.-312 с.

. Веб-аптека: анатоксин столбнячий. Описание препарата. Инструкция по применению. [Електронний ресурс]: Режим доступу <http://www.webapteka.ru/drugbase/name8249.html>.

. Кашпур Н.В., Волянська Н.П., Чернявский В.И. Некоторые механизмы формольной детоксикации столбнячего токсина - Харьков, 2009

. Клостридии столбняка и столбняк . [Електронний ресурс]: Режим доступу <http://vse-zabolevaniya.ru/mikrobiologija/klostridii-stolbnjaka-stolbnjak.html>

. Биология и медицина. [Електронний ресурс]: Режим доступу <http://medbiol.ru/medbiol/microbiol/0000589b.htm>

. Культуральные свойства возбудителя столбняка. Антигенная структура столбняка. Биохимические свойства столбняка. [Електронний ресурс]: Режим доступу <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/421.html>

. Clostridium tetani Growth and Toxin Production in the. Intestines of Germfree Rats/ Departments of Surgery and Medical Microbiology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin S3706

. Биологическая опасность и уровни биологической безопасности. [Електронний ресурс]:Режим доступу <http://laborant.net/specialist/publications/lamboxarticle/83/>

. Лабораторный биореактор CelliGen BLU. [Електронний ресурс]: Режим доступу <http://labinstruments.su/equipment/bioreaktory-i-fermentery-celligen-blu>

. Ламинарный бокс класс II, тип А2 "БМБ- II-Ламинар-С-1,2" . [Електронний ресурс]: Режим доступу <http://veresk-med.ru/bav-laminar-s-protect-310180.html>

. Сыворотка противостолбнячная ФС. [Електронний ресурс]:Режим доступу <http://www.rosminzdrav.ru/documents/7992-rasporyazhenie-pravitelstva-rf-1344-r-ot-21-oktyabrya-2004-g>

. Буценко Л.М., Красінько В.О. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Лабор. Практикум - К.:НУХТ,2011. - 82с.

. Методи контролю харчових виробництв/Мельник С.Р.,Мельник Ю.Р - Львів; Національний університет «Львівська політехніка», 2005. - 26с.