

И. В. Павленко, А. Я. Самуйленко, В. И. Еремец,
А. А. Нежута, З. А. Канарская, А. В. Канарский

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СИМБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ПРОЛИЗЭР НА ОСНОВЕ *Escherichia coli* VL-613. ЧАСТЬ 2.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СОХРАНЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *Escherichia coli* VL-613 В СИМБИОТИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ ПРОЛИЗЭР

Ключевые слова: биомасса *Escherichia coli* VL-613, концентрирование, защитные среды, сушка, симбиотический препарат.

Оптимизированы условия сохранения жизнеспособности Escherichia coli VL-613 в симбиотическом препарате Проллизер. Разработана технология производства симбиотического препарата Проллизер, продуцирующего лизин в организме животных.

Keywords: strain *Escherichia coli* VL-613 concentration, the protective medium, drying, symbiotic formulation.

Optimized the conditions for preserving the viability of the strain Escherichia coli VL-613 in a symbiotic preparation Prolizer. The technology of production of symbiotic drug Prolizer, producing lysine in animals.

Актуальность. Технология изготовления сухих живых бактериальных препаратов - многоцелевая проблема, одной из ключевых направлений которой является разработка современных процессов концентрирования микроорганизмов, позволяющая увеличить выход конечного продукта и получить эффективные биопрепараты.

Для получения концентрированной микробной биомассы используют различные методы: флотацию, сепарирования, фильтрацию, экстракцию, ионный обмен, адсорбцию, кристаллизацию, мембранные методы и др. Как правило, технология выделения и очистки продукта включает несколько стадий [1, 2, 3, 4].

Сушка - один из самых распространенных технологических процессов, используемый в биотехнологической промышленности. Как правило, сушка является завершающим этапом технологического процесса получения целевого продукта.

В промышленной технологии производства биологических препаратов сушка, как завершающий этап, существенным образом сказывается на качестве выпускаемой продукции (сухие экстракты, ферменты, витамины, антибиотики, вакцины и др.) [5, 6, 7]. Особое значение для ветеринарной практики имеет высушивание живых микробных вакцин, позволяющее длительно сохранять иммуногенные свойства этих препаратов. Совершенствованием оборудования и оптимизацией технологических режимов сублимационного высушивания нельзя добиться полного успеха без оптимизации состава питательных сред, условий культивирования, состава защитных сред и т.п. [8, 9, 10]. В этой связи всесторонний подход к оптимизации условий сохранения жизнеспособности микроорганизмов, используемых для получения симбиотических препаратов весьма актуален.

Цель работы - оптимизация условий сохранения жизнеспособности *Escherichia coli* VL-613 в симбиотическом препарате Проллизер.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- определение влияния продолжительности хранения культуры перед концентрированием на сохранение жизнеспособности *Escherichia coli* VL-613 в препарате Проллизер;

- оптимизация состава защитной среды высушивания *Escherichia coli* VL-613, используемого при изготовлении симбиотического препарата Проллизер.

Определение влияния продолжительности хранения культуры перед концентрированием на сохранение жизнеспособности *E. coli* VL-613 в препарате Проллизер. Для решения этой задачи были изготовлены опытные серии препаратов в трех повторностях. Для каждой повторности технология культивирования, концентрирования, сушки и защитная среда (сахарозо-желатиновая на КФБ) была одинаковой.

Серии препарата готовили по следующей схеме:

- 1 - бактериальную культуру сразу концентрировали;

- 2 - бактериальную культуру концентрировали через один час после культивирования;

- 3 - бактериальную культуру концентрировали через полтора часа после культивирования.

В экспериментах определялось количество жизнеспособных эшерихий в изготовленных препаратах при их хранении до 12 месяцев.

В таблице 1 представлены данные по сохраняемости жизнеспособных эшерихий от времени начала концентрирования бактериальной культуры после культивирования.

Таблица 1 - Зависимость жизнеспособности *E. coli* VL-613 в препарате от продолжительности хранения культуры перед центрифугированием

Повторность приготовления препарата	Продолжительность хранения после культивирования до центрифугирования, ч.	Количество жизнеспособных эшерихий после сушки, млрд/см ³	Количество жизнеспособных эшерихий (млрд/см ³) при продолжительности хранения, месяцев				
			1	2	3	6	12
1	0	5,61	5,52	5,47	5,23	5,06	4,82
	1,0	5,49	5,32	5,28	5,01	4,87	4,67
	1,5	5,52	4,24	3,26	2,07	2,01	1,92
2	0	10,20	10,10	10,15	9,95	9,72	9,63
	1,0	10,39	10,29	10,21	10,20	9,81	9,54
	1,5	10,18	9,56	7,89	7,02	6,89	6,47
3	0	8,31	8,40	8,30	8,30	8,12	8,01
	1,0	8,30	8,26	8,22	8,16	8,02	7,89
	1,5	8,19	8,00	6,89	5,24	4,98	4,73

Представленные результаты позволяют сделать вывод о зависимости сохраняемости жизнеспособных эшерихий при хранении препаратов от продолжительности хранения перед центрифугированием. В частности, хранение бактериальной массы перед центрифугированием 1,5 часа приводит к снижению концентрации жизнеспособных эшерихий в препарате при длительном его хранении в 1,57 – 2,9 раза.

*Оптимизация состава защитной среды высушивания *E. coli* VL-613, используемого при изготовлении симбиотического препарата Пролизер.* Известны различные защитные среды для сохранения максимального количества живых бактерий рода *Escherichia* после лиофильного высушивания.

На начальном этапе разработки защитной среды *E. coli* VL-613 были выбраны семь сред:

1. сыворотка крови КРС + 75 %; мясная вода с 5 % сахарозы 25 %;
2. декстран (1 % раствор) + 75 %; мясная вода с 5 % сахарозы 25 %;
3. обезжиренное молоко (обрат) 100 %;
4. обезжиренное молоко (обрат) с 7 % сахарозы 100 %;
5. обезжиренное молоко (обрат) + 50 %; сыворотка крови КРС 50 %;
6. СЖС на КФБ, ее состав:
 - сахароза – 8 – 12 %;
 - желатин – 0,4 – 0,6 %;
 - тиомочевина – 0,4 – 0,6 %;

- калий фосфорнокислый двузамещенный - 0,4 – 0,6 %;
- калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,14 – 0,2 %.

7. СЖС на КФБ ее состав:

- желатин - 1,5 %;
- сахароза - 5,0 %;
- декстран - 3,0 %.

Предварительные исследования по разработке защитной среды для эшерихий проводили в культуре, полученной во флаконах с перемешиванием на шуттель-аппарате, для концентрирования бактериальной культуры использовали лабораторные центрифуги К-70Д и S-60.

Результаты исследований были переведены в относительные единицы для того, чтобы достоверность выводов не зависела от начальной концентрации эшерихий после сублимационной сушки.

За относительную единицу была выбрана концентрация живых микроорганизмов при длительном хранении относительно концентрации эшерихий после сушки, принятой за 100 %, по месяцам хранения.

В таблице 2 представлены результаты экспериментов, отражающие зависимость жизнеспособности *E. coli* VL-613 от состава защитной среды, лиофильного высушивания и продолжительности хранения.

Таблица 2 - Зависимость жизнеспособности *E. coli* VL-613 от состава защитной среды, лиофильного высушивания и продолжительности хранения

№ защитной среды*	Количество живых м.к. до сушки, млрд./см ³	Количество живых м.к. после сушки, млрд./см ³ / %	Количество живых м.к. млрд. см ³ / %, при хранении в течение, месяцев		
			1,0	2,0	4,0
1	12,9	0,3 / 100	0,23 / 76,7	0,03 / 13,0	0 / 0
2	38,3	6,7 / 100	6,1 / 91,0	5,9 / 88,1	5,2 / 77,6
3	21,0	0,2 / 100	0,15 / 75,0	0,06 / 3,0	0 / 0
4	24,2	9,9 / 100	6,7 / 67,7	4,2 / 42,4	3,1 / 31,3
5	17,8	0,06 / 100	0,01 / 16,7	0 / 0	0 / 0
6	33,0	9,9 / 100	6,8 / 68,7	5,7 / 57,6	4,6 / 46,5
7	29,0	15,7 / 100	10,9 / 69,4	10,2 / 65,0	9,5 / 60,5

*Состав указан выше

Из представленных таблицы 2 результатов следует, что лучшими защитными свойствами для эшерихий обладает среда № 7 - СЖС на КФБ с соотношением компонентов:

- желатина - 1,5 %;
- сахарозы - 5,0 %;

- декстрана - 3,0 %.

Для решения задачи по оптимизации защитной среды для эшерихий использовали план полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^4 .

Критерием оптимизации «У_i» для нахождения оптимальной по составу защитной среды при сушке эшерихий выбрана концентрация живых микроорганизмов после сушки относительно концентрации эшерихий до сушки, принятой за 100%.

Критерием оптимизации «У_i» для нахождения оптимальной защитной среды при длительном хранении выбрана концентрация живых микроорганизмов при длительном хранении относительно концентрации эшерихий после сушки, принятой за 100 %, где i - месяц хранения.

Критерий оптимизации выбрали в относительных единицах для того, чтобы результаты не зависели от начальной концентрации эшерихий в препарате после сублимационной сушки.

По данным предварительных опытов выбраны следующие факторы защитной среды для сублимационной сушки эшерихий:

X₁ - концентрация желатина;

X₂ - концентрация сахарозы;

X₃ - концентрация декстрана;

X₄ - вода или калий-фосфатный буфер

(КФБ).

В таблице 3 представлен план ПФЭ 2^4 .

Таблица 3 - План ПФЭ 2^4 в кодированной и натуральной размерностях

№ опыта	Кодированная размерность факторов				Натуральная размерность факторов			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Желатин, %	Сахароза, %	Декстран, %	Вода или КФБ
1	-	-	-	-	1,0	5,0	0	Вода
2	-	+	-	-	1,0	10,0	0	Вода
3	+	-	-	-	2,0	5,0	0	Вода
4	+	+	-	-	2,0	10,0	0	Вода
5	-	-	+	-	1,0	5,0	3	Вода
6	-	+	+	-	1,0	10,0	3	Вода
7	+	-	+	-	2,0	5,0	3	Вода
8	+	+	+	-	2,0	10,0	3	Вода
9	-	-	-	+	1,0	5,0	0	КФБ
10	-	+	-	+	1,0	10,0	0	КФБ
11	+	-	-	+	2,0	5,0	0	КФБ
12	+	+	-	+	2,0	10,0	0	КФБ
13	-	-	+	+	1,0	5,0	3	КФБ
14	-	+	+	+	1,0	10,0	3	КФБ
15	+	-	+	+	2,0	5,0	3	КФБ
16	+	+	+	+	2,0	10,0	3	КФБ
X _{0i}					1,5	7,5	1,5	КФБ
ΔX _i					0,5	2,5	1,5	Вода/КФБ

В таблице 4 представлены экспериментальные данные по сохраняемости жизнеспособных эшерихий на составах защитных средах, согласно плану ПФЭ 2^4 , при сушке.

После реализации экспериментов по плану ПФЭ и статистической обработке данных, получили уравнения регрессии (1), показывающие зависимость сохраняемости жизнеспособных эшерихий от концентрации основных компонентов защитной среды при сушке.

По формулам рассчитывали построчные оценки дисперсии, дисперсию воспроизводимости единичного результата, дисперсию воспроизводимости среднего результата в каждой строке, дисперсию среднего для каждого коэффициента регрессии и доверительную ошибку коэффициентов.

Коэффициенты уравнения регрессии рассчитывали по формулам.

Если $|b_i| > \varepsilon(b_i)$, то оценка коэффициента b_i значимо отличалась от нуля. В противном случае оценку коэффициента считали значимо не отличающейся от нуля, и ее приравнивали к нулю.

$$\bar{Y} = 84,41 + 1,72X_1 + 1,91X_2 - 2,22X_3 + 1,24X_4 + 1,58X_2X_4 + 2,46X_1X_2X_4 - 1,49X_1X_2X_3 + 1,83X_1X_2X_3X_4 \quad (1)$$

Уравнение регрессии (1) описывают сохраняемость жизнеспособных эшерихий при сушке.

На основании полученных данных с вероятностью $q = 0,9$ можно сделать вывод, что уравнения (1) адекватно описывают экспериментальные данные ($F_{\text{рас.}} = 1,98 < F_{\text{теор.}} = 2,18$).

Выживаемость эшерихий повышается как при увеличении концентрации желатина, так и при увеличении концентрации сахарозы, и при использовании в качестве растворителя КФБ вместо воды, так как X₁, X₂ и X₄ в уравнение (1) имеют положительные коэффициенты. При увеличении концентрации декстрана выживаемость эшерихий уменьшается, потому что X₃ в уравнении имеет знак «-».

Анализируя полученные данные по оптимизации состава защитной среды для сушки эшерихий, можно прийти к выводу, что лучший опыт плана ПФЭ 2^4 № 12 (таблицы 4). Далее проведены эксперименты по оптимизации защитной среды при длительном хранении согласно плану ПФЭ 2^4 (таблицы 4). Количество жизнеспособных эшерихий при длительном хранении определялось через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев и рассчитывалось уравнение регрессии для каждого месяца хранения соответственно.

В таблице 4 представлены данные по сохраняемости жизнеспособных эшерихий на составах защитных сред по плану ПФЭ 2^4 при длительном хранении – с 1 по 12 месяцев хранения.

После реализации экспериментов по плану ПФЭ и статистической обработке данных получили уравнения регрессии (2 - 6), показывающие

зависимость сохраняемости эшерихий от концентрации основных компонентов защитной среды после 1, 3, 6, 9, 12 месяцев хранения.

По формулам рассчитывали для указанных сроков хранения построчные оценки дисперсии, дисперсию воспроизводимости единичного результата, дисперсию воспроизводимости среднего результата в каждой строке, дисперсию среднего для каждого коэффициента регрессии и доверительную ошибку коэффициентов. Удаляем незначимые коэффициенты уравнений.

Таблица 4 - Сохраняемость жизнеспособных *E. coli* после сушки и хранения с 1 по 12 месяцев на составах защитных сред, согласно плану ПФЭ 2⁴ (*)

У _{ср.} , млрд/см ³ до сушки	У _{ср.} , млрд/см ³ после сушки	У _{ср1} , млрд/см ³	У _{ср3} , млрд/см ³	У _{ср6} , млрд/см ³	У _{ср9} , млрд/см ³	У _{ср12} , млрд/см ³
10,33	8,50	7,50	7,00	5,67	5,17	4,83
9,33	7,50	6,17	5,50	5,00	4,83	4,83
9,83	9,00	7,33	6,50	6,17	6,00	5,83
8,00	7,00	6,00	5,50	5,45	5,33	5,17
8,33	6,00	4,00	3,00	2,50	2,33	2,00
7,67	6,67	6,00	4,83	4,50	4,00	3,83
9,17	7,83	7,00	6,17	6,17	6,00	5,83
10,33	8,17	7,17	5,83	5,33	5,17	5,00
9,17	7,67	5,17	4,33	4,00	3,83	3,17
7,83	7,17	5,33	3,83	3,33	3,00	2,83
9,67	8,00	6,67	6,17	6,00	5,83	5,50
12,83	12,00	11,50	10,83	10,50	10,00	9,33
9,00	7,50	6,83	6,00	5,17	4,83	4,83
6,75	5,50	3,83	3,33	3,17	2,83	2,67
10,33	8,17	6,67	6,50	5,67	5,67	5,50
10,17	9,17	8,17	7,83	7,50	7,42	7,33

(*) Результаты в строках соответствуют номеру опыта в таблице 3

Уравнения регрессий принимают вид:

$$Y_1 = 82,74 + 4,03X_1 + 1,59X_2 + 1,88X_1X_4 + 7,41X_2X_4 + 3,07X_1X_3X_4 - 3,21X_1X_3X_4 + 3,66X_1X_2X_3X_4 \quad (2)$$

$$Y_3 = 77,03 + 2,13X_1 + 2,47X_2 + 4,06X_3 + 4,64X_4 - 4,43X_1X_3 + 8,29X_3X_4 - 4,17X_1X_2X_3 - 8,51X_1X_3X_4 + 1,48X_1X_2X_3X_4 \quad (3)$$

$$Y_6 = 66,98 + 8,53X_1 + 1,85X_2 + 2,54X_1X_4 + 2,69X_3X_4 - 2,69X_1X_2X_3 + 4,49X_1X_2X_4 -$$

$$- 3,81X_1X_3X_4 + 3,39X_1X_2X_3X_4 \quad (4)$$

$$Y_9 = 63,82 + 9,83X_1 + 1,36X_2 + 2,50X_1X_4 + 2,94X_3X_4 - 2,15X_1X_2X_3 + 4,48X_1X_2X_4 - 3,35X_1X_3X_4 + 2,89X_1X_2X_3X_4 \quad (5)$$

$$Y_{12} = 60,87 + 10,14X_1 + 1,96X_2 + 2,37X_1X_4 + 4,14X_3X_4 + 4,71X_1X_2X_4 - 3,68X_1X_3X_4 + 3,54X_1X_2X_3X_4 \quad (6)$$

Уравнения регрессии (2 - 6) описывают сохраняемость эшерихий при хранении через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев, соответственно. На основании полученных данных с вероятностью $q = 0,9$ можно сделать вывод, что уравнения (2 - 6) адекватно описывают экспериментальные данные ($F_{\text{рас.}} = 1,58; 2,12; 1,21; 1,08; 2,04 < F_{\text{теор.}} = 2,15$).

Это значит, что в указанных интервалах варьирования выживаемость эшерихий при хранении зависит от концентрации основных компонентов защитных сред в течение каждого месяца хранения:

- X₁ - концентрация желатина;
- X₂ - концентрация сахарозы;
- X₃ - концентрация декстрана;
- X₄ - КФБ.

Причем, выживаемость эшерихий повышается при увеличении концентрации желатина, концентрации декстрана и сахарозы, и при использовании в качестве растворителя КФБ вместо воды, так как X₁, X₂, X₃ и X₄ в уравнениях (2 - 6) имеют положительные коэффициенты.

В уравнениях (2 - 6) значимыми являются эффекты межфакторного взаимодействия. Это означает, что опыты ПФЭ 2⁴ поставлены в области факторного пространства с высокой кривизной поверхности отклика, т. е. вблизи оптимума.

Окончанием эксперимента по оптимизации состава защитной среды можем считать лучший опыт плана ПФЭ 2⁴ № 12 (таблицы 3).

Наилучшей защитной средой высушивания является среда, в которой концентрация основных компонентов имеет следующие значения:

- желатин – 2,0 %;
- сахароза – 10,0 %;
- декстран – 0 %.

В качестве растворителя - калий фосфатный буфер.

Выводы

Разработана модель основных технологических этапов и технология промышленного производства симбиотического препарата Проллизер на основе *E. coli* VL-613. Применение разработанной модели технологии процесса получения и хранения симбиотического препарата при промышленном производстве:

- позволило в 1,8 раза повысить накопление *E. coli* VL-613 за счет лучших ростовых качеств разработанной питательной среды;
- разработанный управляемый режим культивирования *E. coli* VL-613 позволяет сократить

продолжительность культивирования с 8 – 24 часов до 4 – 6 часов;

- разработанная защитная среда высушивания позволяет увеличить сохраняемость жизнеспособных микроорганизмов при длительном хранении (12 месяцев) на 20 – 40 % по сравнению с использованием традиционной защитной среды высушивания.

Изготовленные опытно-промышленные партии симбиотического препарата Пролизэр прошли успешные испытания, с положительным результатом, в птицеводческих и животноводческих хозяйствах [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17].

Литература

1. В.М. Кантере. Теоретические основы технологии микробиологических производств. М.: Агропромиздат. 272 с. (1991).
2. И.В. Павленко. Ветеринария и кормление. М. № 6. С. 34 – 35 (2012).
3. H.A. Bardelmeijer, M. Ouweland, J.H. Beijen, J.H.M. Schellens, O. Telling. J. Chromatogr. B. 763. P. 201. (2001).
4. L. Zhou, D. Tan, J. Theng. J. Chromatogr. B. 754. P. 20. (2001).
5. А.А. Нежута, Е.С. Сербис. Материалы Межд. научно-практ. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». Щелково, С. 415 - 420. (2005).
6. А.Я. Самуйленко, А.А. Нежута, В.И. Еремец, Э.Ф. Токарик, Е.С. Сербис. Материалы Межд. научно-практ. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных». Владимир. С. 379 - 383 (2003).
7. Е.С. Сербис, А.А. Нежута, В.И. Еремец, Т.А. Скотникова. Вестник РАСХН. М. № 4. С. 65 - 66 (2002).
8. А.А. Нежута, Э.Ф. Токарик, А.Я. Самуйленко. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. Курск. Изд-во Курской гос. сельскохозяйственной академии. 240 с. (2002).
9. И.В. Павленко. Ветеринария и кормление. М. № 6. С. 34 – 35 (2012).
10. О.В. Провоторова, И.В. Павленко, Л.А. Неминущая, А.А. Нежута, А.Я. Самуйленко. Ветеринарный врач. Казань. № 1. С. 28 – 30 (2013).
11. Л. Эрнст, А. Самуйленко, Е. Школьников, В. Меньшенин, И. Павленко, А. Раевский, Е. Рахманина, И. Егоров, Е. Андрианова, И. Салеева. Птицеводство. М. № 4. С. 35-36 (2011).
12. И.В. Павленко, А. Гринь, В. Меньшенин, И. Егоров, И. Салеева, А. Иванов, Д. Ефимов. Птицеводство. М. № 6. С. 19-22 (2012).
13. А.Я. Самуйленко, Е.Э. Школьников, А.А. Раевский, И.В. Павленко, Л.В. Анисимова, Л.А. Коротеева. Материалы Межд. научно-практ. конф. посвященной 90-летию СибНИВИ - ВНИИБТЖ «Инфекционная патология животных». Омск. С. 220-223 (2011).
14. Cursino L. et al. Exoproducts of the Escherichia coli and in vivo //J.Appl. Microbiol. 100, № 4. P. 821-829. (2006).
15. Weichselbaum E. Probiotics and health: A review of the evidence //Nutr.Bull. 34, № 4. P. 340 - 373. (2009).
16. Скотникова Т.А., Неминущая Л.А., Еремец Н.К., Провоторова О.В., Бобровская И.В., Малышева М.А., З.А. Канарская. Вестник Каз. технол. ун. Т. 15. № 4. с. 82 – 87. (2012).
17. Неминущая Л.А., Скотникова Т.А., Титова Е.И., Провоторова О.В., Еремец Н.К., Бобровская И.В., З.А. Канарская. Вестник Каз. технол. ун. Т. 15. № 4.с. 69 – 74. (2012).

© И. В. Павленко – канд. биол. наук, зав. экспериментально-производственной лаб. отдела бактериальных препаратов, ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, polt65@yandex.ru; А. Я. Самуйленко – д-р ветер. наук, проф., академик РАСХН, академик НААН Украины, директор ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; В. И. Еремец - д-р биол. наук, проф., зам. директора ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, biv_74@mail.ru; А. А. Нежута – д-р биол. наук, зав. отделом сушки изготовления биопрепаратов, ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; З. А. Канарская – канд. тех. наук, доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru; А. В. Канарский – д-р техн. наук, проф. той же кафедры, alb46@mail.ru.