

А. Я. Самуйленко, И. В. Павленко, Н. К. Еремец,
А. А. Нежута, И. В. Бобровская, Л. А. Неминушая,
Н. Д. Скичко, И. И. Бережной, В. А. Гаврилов,
И. В. Ковальский, С. В. Гаврилов, З. А. Канарская

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СИМБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА «СИМБИОХИТ»

Ключевые слова: хитозан, защитная среда, симбиотический препарат, сушка.

Разработан перспективный симбиотический препарат на основе штамма *Escherichia coli* VL-613 «СИМБИОХИТ» с использованием оптимизированной защитной среды высушивания с применением хитозана. Защитная среда с применением хитозана позволяет повысить выживаемость микроорганизмов при сублимационном высушивании и длительном хранении препарата на 15 - 17 % по сравнению с защитной средой, используемой при изготовлении препарата «Пролизер».

Keywords: chitosan, protective environment symbiotic preparation, drying.

Worked out a symbiotic preparation on the basis of the strain *Escherichia coli* VL-613 "SIMBIOHIT" using optimized protective drying of the medium using chitosan. Protective environment with the use of chitosan improves the survival of microorganisms in the dried-sublimation Shivani and long-term storage of the drug by 15 -17% compared with the protective medium used in the manufacture of the drug "Prolizer".

Актуальность. Обеспечение населения России продовольствием и биологическая защита людей и животных в стране являются основной задачей АПК на современном этапе, что делает актуальными научные исследования в области биотехнологии, направленные на решение этих проблем.

В настоящее время микробиотехнология является активно развивающимся научным направлением, использующим методы биотехнологии при разработке и производстве широкого спектра биопрепаратов (вакцин, сывороток, диагностикумов, пробиотиков), биологически активных веществ (ферментов, антибиотиков, пребиотиков и др.), добавок к кормам (белков и аминокислот). Применение этих биопродуктов в животноводстве и птицеводстве способствует повышению продуктивности животных и птицы, обеспечению ветеринарного благополучия хозяйств, гарантии качества, биологической и экологической безопасности биопродукции и ее производства.

Вступление России в ВТО повысило требования к конкурентоспособности отечественной продукции, что делает необходимым реконструкцию (реинжиниринг) производств многих предприятий биологической, химической и пищевой промышленности и разработку новых или усовершенствование традиционных промышленных технологий производства препаратов.

Основы разработки, оптимизации, моделирования технологий микробиологических производств и процессов микробиологического синтеза отражены в работах [1]. Эти разработки актуальны и для предприятий, выпускающих лекарственные средства для животных, в том числе и иммунобиологические препараты, с точки зрения обеспечения их безопасности и качества.

В настоящее время в области разработки новых и усовершенствования существующих промышленных технологий производства сухих живых бактериальных препаратов не существует единого мето-

дологического подхода, основанного на использовании методов системного анализа.

Традиционные технологии разработаны на основе эмпирических подходов и зачастую не удовлетворяют современным национальным и международным требованиям, предъявляемым к технологическим характеристикам (ТТХ) производства и обеспечивающим качество продукции. Поэтому остается много нерешенных технических и технологических проблем совершенствования существующих и создания новых технологий промышленного производства бактериальных препаратов.

Семейство энтеробактерий объединяет обширную группу грамотрицательных бактерий, к которым относятся роды *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella* и др. Сальмонеллы патогенны для животных многих видов, наиболее часто сальмонеллезы регистрируют у свиней и птиц. Сальмонеллезы имеют большое эпидемиологическое и эпизоотологическое значение. Возбудителями, в основном, являются *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. typhisuis*, значительно реже обнаруживают *S. glaser*, *S. dublin*, *S. veldagsen*.

Группа бактерий, включенная в род *Escherichia*, насчитывает большое число разновидностей, отличающихся между собой по ферментативным и серологическим свойствам, подвижности, по чувствительности к бактериофагам и колицинам, по степени антагонистической активности и патогенности. Непатогенные виды колибактерий традиционно используются для изготовления пробиотических препаратов [2, 3, 4].

Симбиоз животных и полезных микроорганизмов играет важную роль в нормальном функционировании организма животных и птицы, а так же реализации их генетического потенциала продуктивности. В настоящее время активно развивается использование симбиотиков антагонистов патогенной микрофлоры и продуцента лизина - незамени-

мой аминокислоты, которая входит в состав структурных тканевых белков и белковых ферментов, является важным фактором биологически полноценного кормления, способствует улучшению пищеварения, играет важную роль в формировании костяка, повышении продуктивности сельскохозяйственных моногастричных животных (птицы и свиней). Такие симбиотики используются в качестве альтернативы дорогостоящему синтетическому лизину (моногидрохлорид лизина), в основном, импортного производства. Поэтому разработка новых препаратов такой группы и технологии их производства является актуальной проблемой. Начало решения этих проблем заложено в работах [5, 6, 7, 8, 9, 10].

В настоящее время промышленность выпускает симбиотический препарат «Пролизэр», способ получения которого включает засев культурой, культивирование в жидкой питательной среде на основе перевара Хоттингера, концентрирование бактериальной суспензии с последующим смешиванием со стабилизатором, расфасовку и лиофилизацию препарата; при этом в процессе культивирования *Escherichia coli* VL-613 сразу после засева окислительно-восстановительный потенциал бактериальной культуры снижают до минус (80 - 100) мВ, после чего до окончания процесса культивирования pO_2 поддерживают на уровне $(20 \pm 5) \%$ от насыщения кислородом воздуха, pH регулируют на уровне (7,0-7,4), а дробную подачу глюкозы осуществляют дозами до концентрации (0,1-0,2) % при лимитировании роста *E. coli* VL-613 глюкозой, длительность процесса культивирования составляет 4-6 ч. [11, 12, 13, 14].

В способе получения симбиотический препарат «Пролизэр» на основе штамма *E. coli* VL-613 среда высушивания готовится по следующей прописи: концентрация основных компонентов имеет следующие значения: желатин – 2,0 %; сахароза - 10,0 %. В качестве растворителя - калий фосфатный буфер. [12, 13].

Известно, что повышению стабильности препаратов после сушки и в процессе хранения способствуют различные соединения: это природные и синтетические высокомолекулярные соединения - полисахариды (декстран, декстрин, агароза), соли альгиновой кислоты, желатин и поливинилпирролидон. Они создают защитные барьеры для клеток в процессе сушки, после высушивания, эффективны в концентрациях 1 - 2 %. В более высоких концентрациях (исключая полисахариды) они ухудшают условия удаления влаги при высушивании. Тиомочевина и натриевые соли глутаминовой, лимонной и аскорбиновой кислот, легко окисляясь, блокируют свободнорадикальные и аммоно-карбонильные реакции в сухой биомассе (достаточно 1-3 % этих веществ). В этой связи поиск стабилизаторов для сушки препаратов и сегодня остается весьма актуальным.

Исследования на животных показали, что олигосахариды хитина улучшают функцию кишечника. Другое исследование на животных позволило

предположить, что хитин, хитиновые олигосахариды и хитозан стимулируют неспецифическую иммунную реакцию у мышей, приводящую к созданию Т-клеток, которые атакуют опухолевые клетки. Из сказанного выше, мы решили ввести хитозан в состав защитной среды высушивания.

Учитывая перспективу применения хитина и его производных для получения биопрепаратов для животных, *целью настоящей работы* являлось разработка способа получения симбиотического препарата с применением в составе защитной среды хитозана.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- оптимизация защитной среды высушивания с хитозаном, используемой при изготовлении симбиотического препарата на основе *E. coli*;
- изготовление опытно-промышленных образцов препаратов и проверка срока годности препарата.

Материалы и методы

Объекты исследований. При исследовании и разработке симбиотического препарата - штамм *E. coli* VL-613. Культивирование эшерихий проводили на питательной среде, основой которых являлся перевар Хоттингера.

Технологическое оборудование. Культуру эшерихий выращивали в пробирках и флаконах на шуттель-аппарате, а также в ферментере АНКУМ-2М емкостью 3 и 10 дм³, который оснащен системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования (температура, pH, pO_2 , eH, расход воздуха на аэрацию, скорость вращения мешалки и оптическая плотность бактериальной суспензии).

С целью пеногашения при интенсивном росте в ферментере листерий, сальмонелл и эшерихий применяли пеногаситель пропинол Б - 400.

Содержание pH в культуральной жидкости определяли потенциометрически, уровень растворенного кислорода pO_2 - датчиками изготовленными в СКБ БП (г. Пушкино), eH - потенциометрически с использованием электродов с ионной проводимостью типа ЭО - 01.

Оптическую плотность культуры листерий и *E. coli* измеряли на фотоколориметрах ФЭК - 56, ФЭК - 60, КФК - 2 и блоке оптической плотности аппарата АНКУМ - 2М.

Концентрирование бакмассы листерий, сальмонелл и *E. coli* осуществляли с помощью лабораторных центрифуг К-70Д, S-60 и установки «Сартокон-мини» («Владисарт», г. Владимир).

Замораживание готовых препаратов проводили в холодильных установках ЛСШ-28, с последующим высушиванием в сублиматоре ТГ-50.5.

Методы доклинических испытаний. Морфологию бактериальных культур определяли путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. Культуральные свойства - путем посева их на МПА и МПБ. Жизнеспособность определяли методом последовательного десятичного титрования на чашках Петри с мясопептонным агаром. Длительность фаз роста, максимальной удельной скорости, мини-

мального времени удвоения культур определяли графическим методом.

Статистическая обработка результатов. Для оптимизации защитной среды высушивания использовали метод математического планирования полный факторный эксперимент (ПФЭ) типа 2^n . Расчеты и построение технологических графиков осуществляли с помощью пакета MICROSOFT OFFICE EXCEL 2010, построение технологических и аппаратурных схем – с помощью программы Microsoft Office VISIO 2010.

На основе ранее выполненных исследований [11] была получена бактериальная культура эшерихий *E. coli* VL-613 с общей концентрацией по окончании культивирования 16-30 млрд. м.к./см³.

Для этого в стерильный ферментер, который снабжен системой автоматического контроля и регулирования основных технологических параметров (температура, обороты мешалки, pH, pO₂, eH), загружают жидкую питательную среду - бульон Хоттингера (приготовленный на основе перевара Хоттингера с содержанием 600 – 800 мг % аминного азота), приготовленную по следующей прописи, масс. %:

Перевар Хоттингера	18,0 – 22,0
Пептон	0,8 – 1,2
Натрий фосфорнокислый	
двузамещенный	0,7 – 0,9
Хлористый натрий	0,7 – 0,9
Глюкоза	0,15 – 0,25
Дрожжевой экстракт	0,4 – 0,6
Вода дистиллированная	до 100,0
Готовая стерильная питательная среда	

должна содержать 160 – 180 мг % аминного азота и иметь pH 7,4 – 7,6 ед. pH.

В ферментер с питательной средой инокулируют 18-24-часовую матриксную культуру эшерихий (*E. coli* шт. VL-613), выращенную, в жидкой питательной среде по составу аналогичному со средой культивирования, в соотношении 5-10% от объема питательной среды в ферментере, и культивируют при (37±1) °C в течение 4-7 часов.

После засева ферментера окислительно-восстановительный потенциал (eH) культуральной жидкости снижают до (-100) – (-80) мВ, путем выдержки культуры без подачи воздуха на аэрацию и выключенной мешалке, после чего до окончания процесса культивирования с помощью изменения расхода воздуха на аэрацию и скоростью вращения мешалки поддерживают парциальное давление растворенного кислорода (pO₂) в культуральной жидкости на уровне (20±5) % от насыщения кислородом воздуха, pH культуральной жидкости регулируют на уровне (7,2-7,4) ед. pH подачей 10% -ного раствора NaOH, а дробную подачу глюкозы осуществляют дозами до концентрации (0,1-0,2) % при лимитировании роста эшерихий глюкозой, характеризующемся резким повышением pO₂ при неизменных расходе воздуха и оборотах мешалки и прекращением снижения pH культуральной жидкости.

Общая концентрация эшерихий по окончании культивирования составляет (16-30) млрд. м.к./см³.

Полученную бактериальную культуру концентрируют, осадок смешивают с защитной средой высушивания.

Используя математические методы планирования эксперимента, в частности план полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^3 , была разработана математическая модель и оптимизирована среда высушивания для *E. coli* штамма VL-613 для длительного сохранения биологических свойств симбиотического препарата в процессе сушки и хранения.

В качестве математической модели была взята защитная среда (ЗС) разработанная для симбиотического препарата на основе *E. coli* штамма VL-613, её состав: желатин – 2,0 %; сахароза - 10,0 %; в качестве растворителя КФБ до 100%.

Критерием оптимизации «У₀» для нахождения оптимальной ЗС в процессе сушки эшерихий была выбрана концентрация живых м/о после процесса сушки относительно концентрации эшерихий до процесса сушки, принятой за 100 %.

Критерием оптимизации «У₁» для нахождения оптимальной ЗС в процессе длительного хранения выбрали концентрацию живых микроорганизмов *E. coli* при длительном хранении относительно концентрации после сушки, принятой за 100 %, где i - месяц хранения.

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

- X₁ - концентрация желатина;
- X₂ - концентрация сахарозы;
- X₃ - концентрация хитозана пищевого.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлен план ПФЭ 2^3 . В качестве контрольной ЗС использовали среду для симбиотического препарата на основе *E. coli* штамма VL-613.

Таблица 1 - План ПФЭ в кодированной и натуральной размерностях (n=6)

№ опыта	Кодированная размерность факторов			Натуральная размерность факторов			Накопление эшерихий (У _{ср}) млрд/см ³
	X ₁	X ₂	X ₃	Концентрация желатина, %	Концентрация сахарозы, %	Концентрация хитозана пищевого, %	
1	-	-	-	1,5	5,0	1,0	11,82
2	+	-	-	2,5	5,0	1,0	11,33
3	-	+	-	1,5	10,0	1,0	11,02
4	+	+	-	2,5	10,0	1,0	12,15
5	-	-	+	1,5	5,0	2,0	11,42
6	+	-	+	2,5	5,0	2,0	10,18
7	-	+	+	1,5	10,0	2,0	12,40
8	+	+	+	2,5	10,0	2,0	11,27
X _{0i}				2,0	7,5	1,5	
ΔX _i				0,5	2,5	0,5	
Конт.				2,0	10,0	0,0	12,83

В таблице 2 представлены данные по сохранности ж/с эшерихий на разных ЗС по плану

ПФЭ 2³ в процессе сушки и с 1 по 12 месяц хранения.

Анализируя полученные данные по оптимизации состава ЗС для процесса сушки эшерихий, можем считать опыт №7 плана ПФЭ 2³ (табл. 1) - лучшим.

Таблица 2 - Сохраняемость ж/с эшерихий в различных ЗС согласно плану ПФЭ 2³ в процессе сушки и с 1 по 12 месяц хранения

№ п/п	Уср. до сушки млрд/см ³	Уср, млрд/см ³	ж/с эшерихий по месяцам хранения				
			Уср ₁ , млрд/см ³	Уср ₃ , млрд/см ³	Уср ₆ , млрд/см ³	Уср ₉ , млрд/см ³	Уср ₁₂ , млрд/см ³
1	11,82	11,23	10,38	9,75	8,93	8,75	7,77
2	11,33	9,83	9,33	8,55	7,98	7,80	7,6
3	11,02	9,62	8,98	8,35	7,5	7,07	7,05
4	12,15	11,43	11,07	10,42	9,78	9,13	8,67
5	11,42	10,83	10,38	10,12	9,1	8,70	8,00
6	10,18	10,83	9,08	8,33	7,6	7,15	6,67
7	12,40	12,0	12,00	11,78	11,36	11,14	10,92
8	11,27	10,92	10,62	9,85	9,22	8,97	8,83
К	12,83	12,0	11,5	10,83	10,5	10,0	9,33

Затем проводили эксперименты по оптимизации ЗС в процессе длительного хранения согласно плану ПФЭ 2³ (таблица 1). Количество ж/с эшерихий в процессе длительного хранения будем определять через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев хранения (таблица 2) и рассчитывали уравнения регрессии для каждого месяца хранения соответственно.

Окончанием эксперимента по оптимизации состава защитной среды в процессе длительного хранения можем считать опыт № 7 плана ПФЭ 2³ (таблицы 1).

Оптимизированная среда высушивания готовится по следующей прописи: концентрация основных компонентов имеет следующие значения: желатин – 1,5 %; сахароза - 10,0 %; хитозан пищевой – 2 %. В качестве растворителя - калий фосфатный буфер.

Осадок бактериальной массы после концентрирования смешивали с защитной средой высушивания. После тщательного перемешивания смешанную с защитной средой высушивания бактериальную суспензию до концентрации 10-14 млрд./см³ *E. coli* в жидком препарате и по 2 или 4 см³ расфасовывают с соблюдением условий асептики в стерильные флаконы объемом 10 или 20 см³ и проводят ее сублимационное высушивание.

Контрольная среда высушивания (препарат «Пролизер») готовилась по следующей методике. Концентрация основных компонентов имеет следующие значения: желатин – 2,0 %; сахароза - 10,0 %. В качестве растворителя - калий фосфатный буфер. Концентрация жизнеспособных клеток эшерихий перед сушкой 12,83 млрд/см³.

Оптимизированная среда разрабатываемого препарата высушивания готовилась по следующей

прописи: концентрация основных компонентов имеет следующие значения: желатин – 1,5 %; сахароза - 10,0 %; хитозан пищевой – 2 %. В качестве растворителя - калий фосфатный буфер. Концентрация жизнеспособных клеток эшерихий перед сушкой 12,4 млрд/см³.

На рис. 1 показана зависимость выживаемости *E. coli* в процессе длительного хранения препаратов (срок наблюдения 12 месяцев).

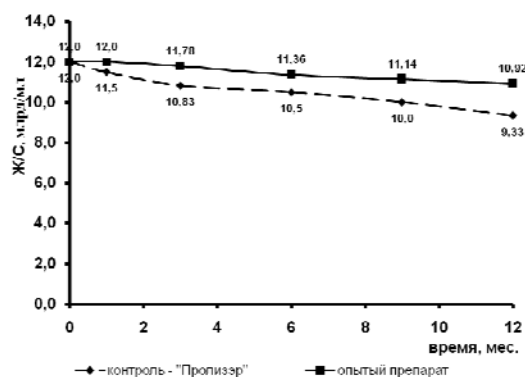


Рис. 1 - Зависимость выживаемости *E. coli* в процессе длительного хранения препаратов (срок наблюдения 12 месяцев)

Анализ представленных результатов по сохраняемости жизнеспособных эшерихий позволяет сделать вывод, что на разработанной защитной среде с применением хитозана *E. coli* эффективней переносят сублимационное высушивание и длительное хранение. В результате увеличивается срок длительного хранения препарата до 12 месяцев и сохраняемость жизнеспособных клеток выше на 15,34 %, чем у ранее используемой защитной среды препарата «Пролизер». Проведенные исследования использованы при разработке технологии нового симбиотического препарата на основе штамма *E. coli* VL-613 с товарной маркой «СИМБИОХИТ».

Вывод

Разработан перспективный симбиотический препарат на основе штамма *E. coli* VL-613 «СИМБИОХИТ» с использованием оптимизированной защитной среды высушивания с применением хитозана. Защитная среда с применением хитозана позволяет повысить выживаемость микроорганизмов при сублимационном высушивании и длительном хранении препарата на 15 - 17 % по сравнению с защитной средой, используемой при изготовлении препарата «Пролизер». На способ получения нового препарата подана заявка на выдачу патента на изобретение № 2014109049 от 11.03.2014 г.

Литература

- В.В. Бирюков, В.М. Кантере, *Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза*. Наука, Москва, 1985. 296 с.
- А.Н. Панин, В.А. Мельников, *Ветеринария*, 1, 12-15 (2011).
- А.Н. Панин, Н.И. Малик, Е.В. Малик, В сб. *Пробиотики в промышленном птицеводстве. Материалы I*

Международного ветеринарного конгресса по птицеводству, М., 2005. С. 235-239.

4. А.Я. Самуйленко, Е.Э. Школьников, П.С. Рахманин, *Ветеринарная медицина*, **2**, 85, 959-961 (2005).
5. О.В. Еремец, М.А. Малышева, Л.А. Неминущая, Л.С. Люлькова, Н.К. Еремец, Т.А. Скотникова, *Ветеринария и кормление*, **6**, 60-61 (2010).
6. Авт. Свид. SU 1354458 (1985).
7. Л.К. Эрнст, А.Я. Самуйленко, Е.Э. Школьников, В.А. Меньшенин, И.В. Павленко, А.А. Раевский, Е.С. Рахманин, И.В. Егоров, Е.Н. Андрианова, И.Д. Салеева, *Птицеводство*, **4**, 35-36 (2011).
8. В.И. Фисинин, И.А. Егоров, Т.М. Околелова, Ш.А. Имангулов, *Кормление сельскохозяйственной птицы*. ВНИТИП, Сергеев Посад, 2002. 360 с.
9. В.И. Фисинин, В.С. Лукашенко, И.П. Салеева, *Технология производства мяса бройлеров*. ВНИТИП, Сергеев Посад, 2008. 252с.
10. Пат. RU 2450051 (2010).
11. И.В. Павленко, А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, А.А. Нежута, З.А. Канарская, А.В. Канарский, *Вестн. Казан. технол ун-та*, **9**, С. 165 – 171 (2013).
12. И.В. Павленко, А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, А.А. Нежута, З.А. Канарская, А.В. Канарский, *Вестн. Казан. технол ун-та*, **9**, С. 171 – 176 (2013).
13. А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, И.В. Павленко, И.П. Салеева, *Экология и промышленность России*, **9**, С. 38 – 40 (2013).

© **А. Я. Самуйленко** – д-р вет. наук, проф., дир. ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; **И. В. Павленко** – канд. биол. наук, зав. лаб. отдела противобактерийных препаратов ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, polt65@yandex.ru; **Н. К. Еремец** – канд. биол. наук, зав. отделом обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства, vnitibp@mail.ru; **А. А. Нежута** - д-р биол. наук, зав. отделом технологии сушки биопрепаратов ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; **Л. А. Неминущая** – д-р биол. наук, зав. лаб. отдела обеспечения качества ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; **И. В. Бобровская** – канд. биол. наук, зав. лаб. технологических методов контроля и доклинических испытаний ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, biv_74@mail.ru; **Н. Д. Скичко** - д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; **И. И. Бережной** – асп. ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; **В. А. Гаврилов** – асп. ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru; **И. В. Ковальский** – асп. ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibp@mail.ru, **С. В. Гаврилов** – асп. – каф. ПИМП, КНИТУ, ser_gavr@mail.ru; **З. А. Канарская** – канд. тех. наук, доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru.