Актуальность. Одним из путей решения задач развития АПК поставленных перед наукой является разработка, производство и применение новых экологически безопасных эффективных препаратов, способных обеспечить нормальное развитие животных, что способствует получения от них качественной продукции [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Этим требованиям соответствуют новые экобиотехнологические препараты, такие как пробиотики, пребиотики, синбиотики (эубиотики) и симбиотики, которые применяют как в здравоохранении, так и в ветеринарии. Такие лечебно-профилактические и ростостимулирующие экологически чистые препараты физиологичны по своему действию, безвредны для животных, просты в наработке, дешевы, технологичны для группового применения, что особенно актуально для отечественного птицеводства и животноводства, занимающего передовые позиции в АПК [2, 3, 4, 6]. Симбиоз животных и микроорганизмов играет важную роль в нормальном функционировании организма животных и птицы, а так же реализации их генетического потенциала продуктивности [9]. При интенсивном ведении птицеводства и свиноводства в условиях промышленной технологии содержания животных биологически полноценное кормление является решающим фактором получения высокой продуктивности. При этом предусматривается обеспечение кормления птицы и свиней не только качественными белковыми и энергетическими компонентами, но и лимитирующими аминокислотами и другими жизненно необходимыми веществами для их роста [10, 11, 12]. Известно, что недостаток лимитирующих аминокислот нельзя восполнить за счет кормов животного происхождения, доля которых в комбикормах для птицы и свиней к тому же снижается, а цена на них растет. Для повышения полноценности кормов из растительных компонентов широко используют премиксы, добавки синтетических аминокислот и др. Среди незаменимых аминокислот лизин занимает особое место. Он входит в состав структурных тканевых белков и белковых ферментов, способствует улучшению пищеварения, играет важную роль в формировании костяка, повышении продуктивности, оказывает благотворное влияние на воспроизводительные функции птицы и свиней. В настоящее время во многих странах при кормлении продуктивных животных и птицы используют синтетический лизин (моногидрохлорид лизина). Замена синтетического лизина, который в основном импортного производства, на симбиотические препараты является основной причиной разработки технологии производства препаратов, которые будучи введенными в желудочно-кишечный тракт животных и птицы продуцируют одну из незаменимых аминокислот – лизин. Альтернативным подходом к решению проблемы восполнения дефицита незаменимой аминокислоты в рационах кормления бройлеров высокопродуктивных кроссов является использование симбиотических препаратов, которые в тонком отделе кишечника, вступают в симбиоз внутри организма, синтезируют достаточное количество необходимого

для макроорганизма лизина [13, 14, 15, 16, 17,18]. Цель работы – разработка технологии промышленного производства симбиотического препарата Пролизэр на основе Escherichia coli VL-613 - продуцента незаменимой аминокислоты лизина. В соответствии с поставленной целью решались задачи: - оптимизации технологии культивирования Escherichia coli VL-613 для получения симбиотического препарата Пролизэр, основанная на оптимизации состава питательной среды и управляемого глубинного культивирования Escherichia coli VL-613; - оптимизации условий сохранения жизнеспособности Escherichia coli VL-613 в симбиотическом препарате Пролизэр, которая основывалась на определение влияния продолжительности хранения препарата перед концентрированием на сохранение жизнеспособности Escherichia coli VL-613 и оптимизации состава защитной среды высушивания, используемой при изготовлении симбиотического препарат Пролизэр. Материалы и методы При исследовании основных технологических процессов промышленного производства симбиотического препарата использовали E. coli VL-613. E. coli VL-613, регистрационный номер коллекции - В – 3423, уровень синтеза лизина до 6 мкг/мл, способен размножаться в пищеварительном тракте сельскохозяйственных животных и птиц, штамм не патогенен. Культивирование эшерихий проводили на питательных средах, основой которых являлся перевар Хоттингера. Культуру эшерихий выращивали в пробирках и флаконах на шуттель-аппарате, а также в лабораторных установках АНКУМ-2М емкостью 10 литров, которые оснащены системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования: - температура; - pH; - парциальное давление растворенного кислорода (pO2); - окислительно-восстановительный потенциал (eH); - расход воздуха на аэрацию; - скорость вращения мешалки; - оптическая плотность бактериальной суспензии. Содержание pH в культуральной жидкости определяли потенциометрически, уровень растворенного кислорода pO2 датчиками изготовленными в СКБ БП (г. Пущино), eH - потенциометрически с использованием электродов с ионной проводимостью типа ЭО - 01. Оптическую плотность культуры E. coli VL-613 измеряли на фотоколориметрах ФЭК - 56, ФЭК - 60, КФК - 2 и блоке оптической плотности аппарата АНКУМ - 2М. Морфологию E. coli VL-613 определяли путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. Культуральные свойства - путем высева культуры на мясо-пептонный агар (МПА) и мясо-пептонный бульон (МПБ). Жизнеспособность E. coli VL-613 определяли методом последовательного десятичного титрования на чашках Петри с мясопептонным агаром. Для определения длительности фаз роста E. coli VL-613, максимальной удельной скорости, минимальной продолжительности удвоения (генерации) использовали графический метод. Замораживание готового препарата производили в холодильных установках ЛСШ-28, а потом высушивали в сублиматоре ТГ-50. Процесс сублимационного высушивания препарата проводили в ранее

отработанном режиме по «Методике расчета режимных параметров сублимационной сушки биопрепаратов». Экспериментальные образцы симбиотического препарата испытывали на безвредность на белых мышах и цыплятах. Препарат считают безвредным, если цыплята опытной и контрольной групп остаются живыми и клинически здоровыми при наблюдении за ними в течение 10 суток. Для оптимизации технологических этапов производства препаратов использовали методы математического планирования: метод Гаусса – Зайделя, дробный или полный факторный эксперимент (ДФЭ или ПФЭ) типа 2 n и метод «крутого» восхождения, где n - число факторов. Оптимизация состава питательной среды для управляемого процесса культивирования E. coli VL-613. На начальном этапе разработки питательной среды для глубинного управляемого культивирования E. coli VL-613 за математическую модель была выбрана среда для выращивания сальмонелл разработанная ГНУ «ВНИТИБП» РАСХН, патент РФ № 2129016 «Способ изготовления вакцины против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных». Питательную среду (математическая модель) готовили по прописи, масс. %; - перевар Хоттингера - 18,0 – 22,0; - пептон - 0,4 – 0,6; - натрий фосфорнокислый двузамещенный - 0,3 – 0,6; - хлористый натрий - 0,7 – 0,9; - вода дистиллированная - до 100,0. Готовая стерильная питательная среда содержит 160 – 180 мг % аминного азота, pH 7,4 – 7,6. При проведении культивирования в ферментере на данной питательной среде было небольшое накопление E. coli. VL-613, поэтому было принято решение по оптимизации данной питательной среды. Предварительно работу по оптимизации питательной среды для выращивания E. coli проводили во флаконах с перемешиванием на шуттель-аппарате со скоростью 120 об/мин. При проведение опыта во флаконах на контрольной питательной среде взятой за основу, как математическая модель, накопление эшерихий составило 1,8 – 2,2 млрд. м.к. Зная, что питательная среда для эшерихий нуждается в витаминах группы В, в её состав необходимо ввести дрожжевой экстракт, который является хорошим источником витаминов этой группы. Для оптимизации состава питательной среды использовали ПФЭ 23. Критерием оптимизации (У) служило накопление жизнеспособных эшерихий в культуральной жидкости, так как для изготовления симбиотического препарата используются живые клетки. В качестве основных факторов по оптимизации питательной среды исследовали следующие компоненты: X1 - концентрация пептона; X2 - концентрация фосфорнокислого двузамещенного натрия; X3 - концентрация дрожжевого экстракта. В таблице 1 представлен план ПФЭ 23. После реализации экспериментов по плану ПФЭ и статистической обработке данных получили уравнение регрессии (1), связывающее накопление жизнеспособных эшерихий в культуральной жидкости и концентрацию основных компонентов питательной среды, которое адекватно описывает экспериментальные данные (Fрас. = 2,25 Fтеор. = 4,10). У =2,477 + 0,240X1 + 0,115X2 + + 0,306X3 + 0,144X1X3 – -

0,065X2X3 + 0,073 X1X2X3 (1). Таблица 1 - План ПФЭ 23 в кодированной и натуральной размерностях и накопление жизнеспособных эшерихий в питательных средах при культивировании № опыта Кодированная размерность факторов Натуральная размерность факторов Накопление эшерихий (Уср), млрд/см3 X1 X2 X3 Концентрация пептона, % Концентрация натрия фосфорнокислого двузамещенного, % Концентрация дрожжевого экстракта, % 1 - - - 0,4 0,5 0,2 1,82 2 + - - 0,8 0,5 0,2 2,33 3 - + - 0,4 0,7 0,2 2,17 4 + + - 0,8 0,7 0,2 2,37 5 - - + 0,4 0,5 0,4 2,42 6 + - + 0,8 0,5 0,4 2,38 7 - + + 0,4 0,7 0,4 3,05 8 + + + 0,8 0,7 0,4 3,28 X0i 0,6 0,6 0,3 DXi 0,2 0,1 0,1 Исходные данные и результаты опытов по определению влияния компонентов питательной среды на рост эшерихий при «крутом» восхождении представлены в таблице 2. На рисунке 1 представлены данные зависимости накопления E. coli VL-613 от состава компонентов питательной среды по плану ПФЭ и крутого восхождения. Результаты опытов 9 - 13 (табл. 2) показали, что движение по градиенту эффективно, так как достигнутое в опытах 9 - 13 накопление жизнеспособных E. coli VL-613 (3,34 – 3,39 млрд/см3) равно или больше накопления в опыте № 8 (3,28 млрд/см3) - лучшего в матрице планирования ПФЭ 23 (табл. 1). Культивирование E. coli VL-613 на оптимизированной питательной среде показало, что разработанная питательная среда имеет высокие ростовые свойства, накопление жизнеспособных эшерихий на разработанной питательной среде составило 3,34 – 3,39 млрд/см3 по сравнению с контрольной, у которой накопление - не более 1,8 – 2,2 млрд/см3. Таблица 2 - План при «крутом» восхождении в кодированной и натуральной размерностях и накопление жизнеспособных эшерихий в питательных средах при культивировании X1 X2 X3 Концентрация пептона, % Концентрация натрия фосфорнокислого двузамещенного, % Концентрация дрожжевого экстракта, % Накопление эшерихий (Уср), млрд/см3 9 + + + 0,8 0,7 0,4 3,34 10 + + + 1,0 0,8 0,5 3,38 11 + + + 1,2 0,9 0,6 3,39 12 + + + 1,4 1,0 0,7 3,14 13 + + + 1,6 1,1 0,8 3,10 X0i 0,6 0,6 0,3 DXi 0,2 0,1 0,1 По результатам принято решение об окончании процесса поиска оптимальных концентраций основных компонентов ПС для культивирования E. coli. Рис. 1 - Зависимость накопления E. coli VL-613 от состава компонентов питательной среды по плану ПФЭ 23 и крутого восхождения. Рекомендуемая питательная среда для культивирования E. coli VL-613 на основе перевара Хоттингера, имеет следующий состав, мас, %: - 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 - 15 – 0,25; - дрожжевой экстракт - 0,4 – 0,6; - вода дистиллированная - до 100,0. Во всех исследованных образцах E. coli штамма VL-613, полученных на оптимизированной питательной среде, морфология, культуральные и биохимические свойства были типичными для этого штамма, выращенного как во флаконах, так и ферментерах. Разработка управляемого процесса глубинного культивирования E. coli VL-613. Задача

разработки управляемого процесса культивирования заключается в следующем: подбор оптимальных условий, использовали метод математического планирования Гаусса – Зайделя. обеспечивающих достижение максимально возможного результата в промышленном аппарате на основе данных, полученных на пилотной установке. Предварительно работу по оптимизации основных параметров культивирования эшерихий проводили во флаконах с перемешиванием на шуттель-аппарате и аппарате АНКУМ - 2М. Для определения оптимального значения параметров культивирования (pO2, pH, eH) провели эксперименты с использованием метода математического планирования Гаусса – Зайделя. По результатам оптимизации параметров культивирования принят следующий алгоритм выращивания E. coli VL-613. В ферментер с оптимизированной питательной средой инокулируют 18 - 24-часовую матриксную культуру E. coli VL-613, выращенную в питательной среде по составу аналогичному со средой культивирования. Соотношении матриксной культуры 5 – 10 % от объема питательной среды в ферментере, и культивируют при 37 ± 1 °С в течение 4 - 6 часов. После засева ферментера eH культуральной жидкости снижают до минус 100 – минус 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 pO2 в культуральной жидкости на уровне 20 ± 5 % от насыщения кислородом воздуха, pH культуральной жидкости регулируют на уровне 7,2 - 7,4 подачей 10 % 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. Динамика основных параметров управляемого культивирования E. coli, штамма VL-613, на разработанной питательной среде приведена на рисунке 2. Как показали результаты опытов, накопление жизнеспособных E. coli VL-613, составило 16,6 млрд/см3 через 4 - 6 часов культивирования. При этом фаза приспособления продолжалась 0,15 часа, а лог-фаза – 2,2 часа. Максимальная удельная скорость роста популяции E. coli VL-613 составила – 1,64 час-1, а время удвоения - 0,42 часа. Разработанная питательная среда и управляемый режим культивирования E. coli VL-613 вошли в патент RU № 2450051 от 18.08.2010 г. «Способ получения симбиотического препарата на основе Escherichia coli VL – 613». Рис. 2 - Динамика основных параметров управляемого культивирования E. coli штамма VL-613 на разработанной питательной среде pO2 – парциальное давление растворенного кислорода; pH – концентрация водородных ионов; eH – окислительно–восстановительный потенциал; о/п – оптическая плотность; τ – продолжительность культивирования; ↓ - подача глюкозы