

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 Пролизер. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: - определение влияния продолжительности хранения культуры перед концентрированием на сохранение жизнеспособности *Escherichia coli* VL-613 в препарате Пролизер; - оптимизация состава защитной среды высушивания *Escherichia coli* VL-613, используемого при изготовлении симбиотического препарата Пролизер. Определение влияния продолжительности хранения культуры перед концентрированием на сохранение жизнеспособности *E. coli* VL-613 в препарате Пролизер. 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 концентрирования, ч.
Количество жизнеспособных эшерихий после сушки, млрд/см³ Количество жизнеспособных эшерихий (млрд/см³) 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 Пролизэр. 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./см³ Количество живых м.к. после сушки, млрд./см³ / % Количество живых м.к. млрд. см³ / %, 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 2⁴. 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 2⁴. Таблица 3 - План ПФЭ 2⁴ в кодированной и натуральной размерностях № опыта

Кодированная размерность факторов	Натуральная размерность факторов	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	Желатин, %	1,0	5,0	0	Вода
2	Сахароза, %	1,0	10,0	0	Вода
3	Декстран, %	2,0	5,0	0	Вода
4	Вода или КФБ	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 D X_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 2⁴, 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 $\hat{b}_i \hat{e} > e(b_i)$, 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. $\hat{Y} = 84,41 + 1,72X_1 + 1,91X_2 - 2,22X_3 + 1,24X_4 + 1,58X_2X_4 + 2,46X_1X_2X_4 - 1,49X_1X_2X_3 + 1,83X_1X_2X_3X_4$ (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 ($F_{рас.} = 1,98$ $F_{теор.} = 2,18$). 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 X_1 , X_2 и X_4 в уравнение (1) имеют положительные коэффициенты. При увеличении концентрации декстрана выживаемость эшерихий уменьшается, потому что X_3 в уравнении имеет знак «-». Анализируя полученные данные по оптимизации состава защитной среды для сушки эшерихий, можно прийти к выводу, что лучший опыт плана ПФЭ 24 № 12 (таблицы 4). Далее проведены эксперименты по оптимизации защитной среды при длительном хранении согласно плану ПФЭ 24 (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 ДФЭ 24 при длительном хранении – с 1 по 12 месяц 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 средах, согласно плану ПФЭ 24 (*) Уср., млрд/см³ до сушки Уср., млрд/см³ после сушки Уср1, млрд/ см³ Уср3, млрд/ см³ Уср6, млрд/ см³ Уср9, млрд/ см³ Уср12, млрд/ см³ 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:

$Y_1 = 82,74 + 4,03X_1 + 1,59X_2 + 1,88X_1X_4 + 7,41X_2X_4 + 3,07X_1X_3X_4 - 3,21X_1X_3X_4 + 3,66X_1X_2X_3X_4$ (2) $Y_3 = 77,03 + 2,13X_1 + 2,47X_2 + 4,06X_3 + 4,64X_4 - 4,43X_1X_3 + 8,29X_3X_4 - 4,17X_1X_2X_3 - 8,51X_1X_3X_4 + 1,48X_1X_2X_3X_4$ (3)

$Y_6 = 66,98 + 8,53X_1 + 1,85X_2 + 2,54X_1X_4 + 2,69X_3X_4 - 2,69X_1X_2X_3 + 4,49X_1X_2X_4 - 3,81X_1X_3X_4 + 3,39X_1X_2X_3X_4$ (4) $Y_9 = 63,82 + 9,83X_1 + 1,36X_2 + 2,50X_1X_4 + 2,94X_3X_4 - 2,15X_1X_2X_3 + 4,48X_1X_2X_4 - 3,35X_1X_3X_4 + 2,89X_1X_2X_3X_4$ (5)

$Y_{12} = 60,87 + 10,14X_1 + 1,96X_2 + 2,37X_1X_4 + 4,14X_3X_4 + 4,71X_1X_2X_4 - 3,68X_1X_3X_4 + 3,54X_1X_2X_3X_4$ (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 ($F_{рас.} = 1,58; 2,12; 1,21; 1,08; 2,04$ $F_{теор.} = 2,15$). Это значит, что в указанных интервалах варьирования выживаемость эшерихий при хранении зависит от концентрации основных компонентов защитных сред в течение каждого месяца хранения: X_1 - концентрация желатина; X_2 - концентрация сахарозы; X_3 - концентрация декстрана; X_4 - КФБ. Причем, выживаемость эшерихий повышается при увеличении концентрации желатина, концентрации декстрана и сахарозы, и при использовании в качестве растворителя КФБ вместо воды, так как X_1, X_2, X_3 и X_4 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 Пролизер 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].