

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 методологического 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 технико-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 сальмонеллез регистрируют у свиней и птиц. Сальмонеллез имеет большое эпидемиологическое и эпизоотологическое значение. Возбудителями, в основном, являются *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. typhisuis*, значительно реже обнаруживают *S. gleser*, *S. dublin*, *S. voldagsen*. 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 - незаменимой 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 ± 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, pO₂, 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 пропиол Б - 400. 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 листерий и *E.coli* измеряли на фотокolorиметрах 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 высева их на МПА и МПБ. Жизнеспособность определяли методом последовательного десятичного титрования на чашках

Петри с мясопептонным агаром. Длительность фаз роста, максимальной удельной скорости, минимального 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 среды 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 «У_i» 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 2³. 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 (Уср), млрд/см³

№ опыта	X ₁	X ₂	X ₃	Уср, млрд/см ³
1	-	-	-	1,5
2	+	-	-	2,5
3	-	+	-	1,5
4	+	+	-	2,5
5	-	-	+	1,5
6	+	-	+	2,5
7	-	+	+	1,5
8	+	+	+	2,5

В таблице 2 представлены данные по сохраняемости 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/см³ Уср₀, млрд/см³ ж/с эшерихий по месяцам хранения Уср₁, млрд/см³ Уср₃, млрд/см³ Уср₆, млрд/см³ Уср₉, млрд/см³ Уср₁₂, млрд/см³

№ п/п	Уср.до сушки млрд/см ³	Уср ₀ , млрд/см ³	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

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.