

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 1. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *Escherichia coli* VL-613 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
СИМБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ПРОЛИЗЭР**

Ключевые слова: питательная среда, Escherichia coli VL-613, оптимизация культивирования.

Оптимизирован состав питательной среды и глубинное культивирование E.coli VL-613. Параметры оптимизации использованы при разработке технологии культивирования Escherichia coli VL-613 для получения симбиотического препарата Проллизэр.

Keywords: growing medium, Escherichia coli VL-613, the optimization of culture.

Optimized composition of the nutrient medium and deep culturing E.coli VL-613. Optimization parameters used in the development of technology of cultivation Escherichia coli VL-613 for the preparation of the symbiotic Prolizer.

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 работе, 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 (моногохлорид 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 Проллизэр 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 Проллизэр, 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 Проллизэр, которая основывалась на определении влияния продолжительности хранения препарата перед концентрированием на сохранение

жизнеспособности *Escherichia coli* VL-613 и оптимизации состава защитной среды высушивания, используемой при изготовлении симбиотического препарата Проллизр.

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 (pO_2);
- 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 pO_2 - датчиками изготовленными в СКБ БП (г. Пушкино), 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 2^3 .

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:

- X_1 - концентрация пептона;
 - X_2 - концентрация фосфорнокислого двузамещенного натрия;
 - X_3 - концентрация дрожжевого экстракта.
- В таблице 1 представлен план ПФЭ 2^3 .

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 ($F_{рас.} = 2,25 < F_{теор.} = 4,10$).

$$Y = 2,477 + 0,240X_1 + 0,115X_2 + 0,306X_3 + 0,144X_1X_3 - 0,065X_2X_3 + 0,073 X_1X_2X_3 \quad (1).$$

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 (Y _{сп}), млрд/см ³
	X ₁	X ₂	X ₃	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
X _{0i}				0,6	0,6	0,3	
ΔX _i				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

	X ₁	X ₂	X ₃	Концентрация пептона, %	Концентрация натрия фосфорнокислого двузамещенного, %	Концентрация дрожжевого экстракта, %	Накопление эшерихий (Y _{сп}), млрд/см ³
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
X _{0i}				0,6	0,6	0,3	
ΔX _i				0,2	0,1	0,1	

По результатам принято решение об окончании процесса поиска оптимальных концентраций основных компонентов ПС для культивирования *E. coli*.

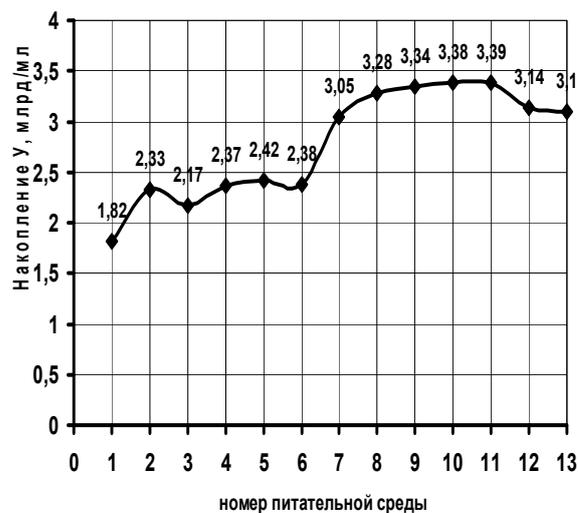


Рис. 1 - Зависимость накопления *E. coli* VL-613 от состава компонентов питательной среды по плану ПФЭ 2³ и крутого восхождения.

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 шутель-аппарате и аппарате АНКУМ - 2М. Для определения оптимального значения параметров культивирования (pO_2 , 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 °C 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 pO_2 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 pO_2 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, накопленные 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».

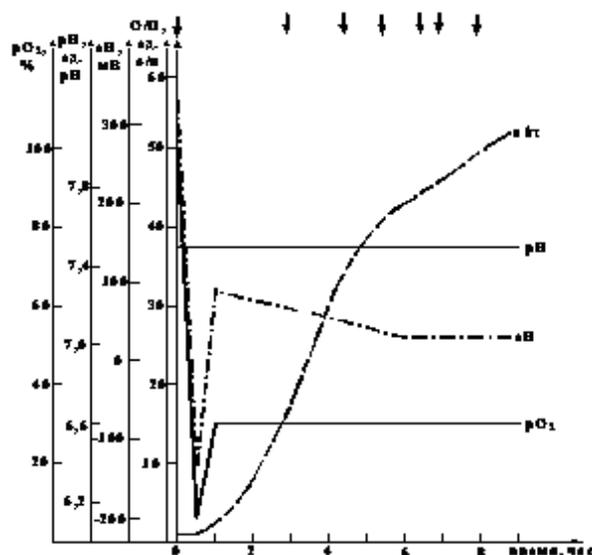


Рис. 2 - Динамика основных параметров управляемого культивирования *E. coli* штамма VL-613 на разработанной питательной среде pO_2 – парциальное давление растворенного кислорода; pH – концентрация водородных ионов; eH – окислительно-восстановительный потенциал; о/п – оптическая плотность; τ – продолжительность культивирования; ↓ - подача глюкозы

Литература

1. С. Гулюшин, Н. Садовникова, И. Рябчик. Актуальные проблемы биологии в животноводстве: материалы V Международной научной конференции. Боровск. С. 283-284 (2010).
2. В. И. Фисинин, Егоров И.А., Имангулова Ш.А. Использование пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков в птицеводстве. Метод. реком. Сергиев Посад: ВНИТИП, 44 с. (2008).
3. А.Н. Панин, Н.И. Малик, Е.В. Малик. Материалы I Международного ветеринарного конгресса по птицеводству. М. С. 235-239 (2005).
4. Л.В. Римарева. Материалы V Межд. научно-практической конференции «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов». М. С. 3 - 7 (2012).
5. В.В. Смирнов, Н.К. Коваленко, В.С. Подгорский. Микробиология. Т. 64. №4. С. 62-80 (2002).
6. В.В. Субботин, Н.В. Данцлевская. Материалы I Международного ветеринарного конгресса по птицеводству. М. С. 239-241 (2005).
7. R.J. Farrell, J.T. LaMont. Microbial factors in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am. Vol.3. P. 41-62 (2002).
8. M.H. Floch, J.Hong-Curtiss. Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders. Curr. Gastroenterol. Rep. Vol. 3. P. 343-350 (2001).
9. И.В. Павленко, А. Гринь, В. Меньшенин, И. Егоров, И. Салеева, А. Иванов, Д. Ефимов. Журнал «Птицеводство». Москва. № 6. С. 19-22 (2012).
10. В.И. Фисинин, И.А. Егоров, Т.М. Околелова, Ш.А. Имангулов. Кормление сельскохозяйственной птицы. Сергеев Посад: Издательство ВНИТИП, 360 с. (2002).
11. В.И. Фисинин, В.С. Лукашенко, И.П. Салеева. Технология производства мяса бройлеров. Сергиев Посад. 252 с. (2008).
12. А.А. Самуиленко, И.В. Павленко, А.А. Раевский, С.А.

Гринь, И.А. Егоров, Е.Н. Андрианова. Вестник Росс. академии сельскохозяйств. наук. № 4. С. 64 – 66 (2012).

13. Л. Эрнст, А. Самуйленко, Е. Школьников, В. Меньшенин, И. Павленко, А. Раевский, Е. Рахманина, И. Егоров, Е. Андрианова, И. Салева. Птицеводство. М. № 4. С. 35-36 (2011).

14. А.Я. Самуйленко, И.В. Павленко, А.А. Раевский, С.А. Гринь, И.А. Егоров, Е.Н. Андрианова. Вестник Росс. академии сельскохозяйств. наук. № 4. С. 64 – 66 (2012).

15. А.Я. Самуйленко, Е.Э. Школьников, А.А. Раевский, И.В. Павленко, В.В. Меньшенин. Свиноводство. М. № 1.С. 42-43 (2012).

16. А.Я. Самуйленко, Л.К. Эрнст, Е.Э. Школьников, А.А.Раевский, Л.К. Эрнст, Л.В. Анисимова, Л.А. Коротеева, И.В. Павленко, И.И. Чеботарев, С.А. Гринь, Н.А. Бондарева Патент RU № 2450051, (2012).

17. 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).

18. 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, rolt65@yandex.ru; **А. Я. Самуйленко** – д-р ветер. наук, проф., академик РАСХН, академик НААН Украины, директор ГНУ ВНИТИБП РАСХН РФ, vnitibr@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, vnitibr@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.