

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «ВОРОНЕЖСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ИМПЕРАТОРА ПЕТРА I»

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И
ТЕХНОЛОГИИ ЖИВОТНОВОДСТВА

Кафедра ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и
паразитологии

«Микробиотехнология»

Методические указания для самостоятельной работы
обучающихся факультета ветеринарной медицины и
технологии животноводства по специальности 36.05.01
«Ветеринария» очной и заочной форм обучения

Воронеж – 2020 г.

Составители: Скогорева А.М., Манжурина О.А.

Рецензент: кандидат ветеринарных наук, доцент Мельникова Н.В.

Методические указания рассмотрены и рекомендованы к изданию на заседании кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии (протокол № 1 от 02.09.2020 г.).

Методические указания рассмотрены и рекомендованы к изданию на заседании методической комиссии факультета ветеринарной медицины и технологии животноводства (протокол № 1 от 10.09.2020 г.).

Введение.

В курс дисциплины «Микробиотехнология» входят вопросы по технологии культивирования пробиотиков и пребиотиков, питательных сред для культивирования молочнокислых микробов, технологии получения молочнокислых бактериальных препаратов, тактике их применения при лечении молодняка сельскохозяйственных животных, больных желудочно-кишечными заболеваниями, которые выносятся на самостоятельное изучение.

Самостоятельная работа выполняется в виде подготовки к зачету, раздел самостоятельной работы проверяется устно во время опроса на зачете.

Контрольные вопросы.

1. Технология изготовления пробиотиков и пребиотиков
2. Технология изготовления биобактона
3. Виды и группы пробиотиков
4. Технология приготовления сухого бактериального препарата Бифиформ
5. Технология изготовления пробиотиков АВИЛАКТ-1К и АВИСТИМ
6. Технология получения бакконцентратов молочнокислых бактерий

1. Технология изготовления пробиотиков и пребиотиков

Молочнокислые микроорганизмы встречаются в различных естественных источниках, где они находятся в ассоциации с другими микроорганизмами. Особенно их много на растениях и в почве. Отсюда они поступают в молоко.

К группе молочнокислых микробов относятся молочнокислые стрептококки, молочнокислые палочки. В молочной промышленности для изготовления различных молочнокислых продуктов наиболее часто применяются мезофильные стрептококки – стрептококкус лактис и креморис, которые относятся к группе гомоферментативных, разлагающих лактозу до молочной кислоты. Они являются активными кислотообразователями, оптимальной температурой их роста является $+30^{\circ}\text{C}$ для стрептококкус лактис и $+25^{\circ}\text{C}$ – для креморис.

Мезофильные гетероферментативные стрептококки *Str paracitrovorus*, *Str diacetylactis*, *Str acetonicus*, *Str citrivorus* при расщеплении лактозы образуют кроме молочной кислоты и другие вещества. Они способны расщеплять лимонную кислоту с образованием ароматобразующих веществ. Оптимальной температурой их роста является $+30^{\circ}\text{C}$, а для *Str citrivorus* и *Str paracitrovorus* $+21-25^{\circ}\text{C}$.

Обе группы мезофильных стрептококков на поверхности агара с гидролизованным молоком через 2 суток образуют S-формы колоний – каплевидные, блестящие, беловатые, размер их около 1-2 мм.

К молочнокислым стрептококкам относятся и термофильные кокковидные бактерии *Str thermophilus*. Они являются сильными кислотообразователями.

К палочковидным молочнокислым бактериям относится род *Lactobacterium*. Он включает в себя три подгруппы.

К подгруппе термофильных палочек относятся:

Lactobacterium Bulgaricum

Lactobacterium helveticum (сыроделие)

Lactobacterium acidophilum.

Все они являются факультативными анаэробами, образуют колонии R-формы. В мазках располагаются поодиночно или в виде стрептобактерий. Являются энергичными кислотообразователями.

К группе стрептобактерий относятся:

Lactobacterium casei

Lactobacterium plantarum.

Они принимают участие в созревании сыра. Это палочки разной длины, располагаются поодиночно, попарно или в виде цепочки.

На плотных средах образуют мелкие круглые колонии S-формы. Оптимальная температура роста около +30° С. Являются слабыми кислотообразователями.

К подгруппе бета-бактерий относятся:

Lactobacterium breve – колонии S –формы, ароматобразующие, температура роста +30° С

Lactobacterium buchneri

Lactobacterium fermenti

Выделяют молочнокислые бактерии из природных источников растительного происхождения (в 1959 г). Выращивают их на стерильном обезжиренном молоке. При культивировании гетероферментативных молочнокислых микробов в питательные среды добавляют 1 % лимоннокислого натрия, а иногда 2 % дрожжевой гидролизат. На этих же средах выращивают закваски для производства молочнокислых продуктов.

В промышленных условиях для культивирования молочнокислых микробов применяют гидролизованное молоко (обезжиренное молоко стерилизуют при температуре +120° С 15 минут, охлаждают до + 45° С, рН – 7,6-7,8, к молоку добавляют панкреатин 1 г/л или 2 г поджелудочной железы и затем хлороформ 5 мл/л.

Смесь выдерживают в закрытых бутылках при температуре +40° С 24 часа. Стерилизуют при +110° С – 30 минут.

В настоящее время бактериальные концентраты из различных молочнокислых бактерий готовят для использования их в качестве заквасок при силосовании, изготовлении молочнокислых продуктов, ветеринарных и медицинских лечебных и профилактических препаратов АБК, бифидумбактерин, казахсил, бирсил, биобактон, лактобрил.

Технология изготовления биобактона

Биобактон представляет собой лиофилизированную культуру ацидофильной палочки, обладающей высокими антибиотическими и

кислотообразующими свойствами. Готовят на гидролизованном молоке.

Культивируют ацидофильную палочку при + 37° С в течение 15 часов. Периодически питательную среду нейтрализуют кальцинированной содой, что обеспечивает накопление бактериальных клеток до 3 млрд/мл. Процесс автоматизирован. В этот период микробы находятся в стационарной фазе, очень активные и стойкие при замораживании.

Микробов отделяют центрифугированием. Производительность сепараторов до 800 л/час при 16 000 об./мин.

Концентрат ацидофильной палочки содержит 250-300 млрд клеток в 1 г.

В качестве среды высушивания используют обрат с сахаром или сахарозно-желатиновую среду. Концентрированную биомассу разбавляют средой высушивания 1:6. Расфасовывают по флаконам и подвергают лиофильной сушке. Флаконы закрывают резиновой пробкой. Осуществляют контроль и реализуют.

В медицине его рекомендуют применять при заболеваниях ЖКТ детей и взрослых, при гепатитах, дисбактериозе, менингитах, гипотрофии, рахитах, анемии.

Препарат применяют внутрь за 30 минут до еды 2 раза в день в дозах от 5 до 20 млрд микробных клеток. Курс лечения – 10-30 дней. Биобактон применяют в комплексе с другим препаратом лактобрилом.

Лактобрил – лиофильно высушенный комплекс, содержащий фурациллин, бриллиантовый зеленый, йодистый калий. Лактобрил обеспечивает полную санацию желудочно-кишечного тракта по отношению к патогенной, условно-патогенной и нормальной микрофлоре. Затем биобактон обеспечивает полное восстановление нормальной молочнокислой микрофлоры молодняка животных. Выздоровление при лечении этим способом составляет 84 % телят и 64 % поросят.

У молодых животных при снижении резистентности организма часто возникают различные заболевания желудочно-кишечного тракта. При этом в процесс вовлекаются условно-патогенные микробы, которые являются причиной заболевания сальмонеллезом, эшерихиозом, дисбактериозом и т. д. В таком случае применяют общепринятые схемы лечения животных с применением антибиотиков или сульфаниламидных препаратов.

Однако при длительном применении в хозяйстве появляются устойчивые к этим препаратам штаммы возбудителей инфекции.

С другой стороны, длительное применение антибиотиков может вызвать угнетение или даже полную гибель не только патогенной, но и полезной микрофлоры кишечника. Это обычно приводит к дисбактериозу, кандидамикозу и образованию токсических соединений.

Являясь нормальным представителем кишечной микрофлоры, ацидофильная палочка при применении биобактона легко приживается в кишечнике. Лечебный эффект биобактона основан на конкретном вытеснении условно-патогенной микрофлоры с последующей стабилизацией биоценоза.

Поэтому при лечении кишечных заболеваний молодняка целесообразно использовать следующую схему применения препаратов:

3-4 дня перорально вводят лактобрил утром за 15-20 минут до кормления из расчета 0,4-0,8 г/животное.

Далее препарат вводят 2 раза в день в тех же дозах.

После этого 3-4 дня животным выпаивают биобактон в дозе 20 млрд микробов на животное по 2-3 раза в день.

Пробиотики – это препараты, содержащие живые культуры микроорганизмов, свойственные собственной нормофлоре кишечника и организма человека и животных.

В зависимости от состава выделяют следующие группы пробиотиков:

1-я группа – **монокомпонентные** – бифидумбактерин, лактобактерин, колибактерин, биовестин и др. В состав их входит один конкретный штамм микроорганизма – представителя облигатной микрофлоры кишечника.

2-я группа – **антагонисты** – бактисубтил, биоспорин, споробактерин, флонивин, энтерол. Это препараты конкурентного действия, не относящиеся к облигатным представителям облигатной микрофлоры кишечника, поэтому длительность их использования ограничивается одной неделей.

3-я группа – **поликомпонентные** – симбиотики – бифацид, биовестин-лакто, примадофилус, полибактерин и др. Это препараты, в которые входит несколько представителей облигатной микрофлоры, находящихся в симбионтных отношениях, то есть усиливающих действие друг друга.

4-я группа – **комбинированные** – бифилиз, кипацид, аципол. Эти препараты имеют в своем составе, кроме облигатных бактерий, дополнительные вещества, оказывающие иммуномодулирующее действие (например, лизоцин, комплексный иммуноглобулин поливалентный).

5-я группа – **симбиотики** – бифиформ, БИОН-3, ламиналакт. Эти препараты сочетают симбионтную облигатную флору и вещества с пребиотическим действием, которые способствуют ее выживанию.

Пребиотики – соединения различного немикробного происхождения, способные стимулировать симбионтную флору кишечника. Таким характеристикам отвечают олигосахариды различных продуктов (молока, круп, хлеба, бобовых, бананов и др.), лактулоза (дюфалак, лактусан, нормазе), пищевые волокна, ферменты микробного происхождения (протеазы сахаромицетов), полисахариды (пектин, инулин), антиоксиданты (витамины А, Е, С, соли селена), экстракты различных водорослей.

Пребиотики применяются для стимуляции роста микроорганизмов нормофлоры кишечника. К ним относятся следующие препараты.

Пантотенат кальция. Участвует в процессах ацетилирования и окисления в клетках, углеводном и жировом обмене, синтезе ацетилхолина, стимулирует образование кортикостероидов в коре надпочечников. Утилизируется бифидобактериями и способствует увеличению их биомассы.

Памба (парааминобензойная кислота). Способствует росту бифидобактерий, лактобактерий и кишечной палочки.

Нормазе (синонимы дюфалак, лактусан). Синтетический дисахарид. Способствует понижению рН содержимого толстого кишечника, снижению концентрации гнилостных бактерий, стимулирует перистальтику кишечника, усиливает рост бифидобактерий.

Лизоцим. Фермент белковой природы. Обладает муколитическими и бифидогенными свойствами, активен в отношении грамположительных кокковых микроорганизмов.

Пребиотики и пробиотики нельзя противопоставлять друг другу. Наиболее оптимальным является их сочетанное применение. При этом пребиотики усиливают терапевтическое действие пробиотиков, способствуют лучшему выживанию пробиотических штаммов в кишечнике.

Лечебная эффективность пробиотического препарата в высокой степени зависит от свойств входящих в его состав штаммов бактерий. **Они должны:**

- обладать высокой антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам;

- быстро размножаться в кишечнике (иметь хорошую скорость роста);

- эффективно и быстро повышать кислотность содержимого кишечника.

В организме животных из множества штаммов, действующих положительно и эффективно, – порядка 10-15. Остальные – либо недостаточно изучены, либо условно-патогенные, патогенные, нейтральные.

Бифидобактерии являются основными представителями нормофлоры кишечника человека. Бифидобактерии – это единственный вид микроорганизмов, у которого не выявлено патогенных для человека свойств. Именно по этой причине для производства многих пробиотиков стали использовать бифидобактерии. В настоящее время описано более 10 видов бифидобактерий, различающихся между собой по биохимическим, физиологическим и серологическим признакам: *B.bifidum*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.pseudolongum*, *B.thermophilum*, *B.suis*, *B.asteroids*, *B.coryneform* и др.

Известно более 500 штаммов этих микроорганизмов. В организме человека и некоторых животных преобладающими штаммами являются *B.bifidum* и *B.longum*. Штамм *B.bifidum* 791/БАГ ГНЦВБ «Вектор» имеет повышенную кислотоустойчивость и кислородоустойчивость по сравнению с другими известными штаммами. Это позволяет бифидобактериям оставаться длительное время жизнеспособными в продукте и помогать быстрой нормализации микрофлоры организма.

Лактобактерии (молочнокислые бактерии) – естественные микроорганизмы желудочно-кишечного тракта и вульво-вагинальной области человеческого организма. При нормальном обмене веществ лактобактерии синтезируют молочную кислоту, перекись водорода, ряд витаминов группы К. От общего количества всех бактерий, находящихся в кишечнике лактобактерии составляют 7-10%. Во всех биотопах пищеварительного тракта (тонкий кишечник, прямая кишка, ротовая полость) обнаруживаются лактобациллы, именно они

являются во влагалищном биотопе доминирующей флорой. Благодаря лактобактериям стимулируется перистальтика кишечника, что очень важно для нормальной работы всего желудочно-кишечного тракта и организма в целом.

Наиболее эффективные на сегодняшний день штаммы *L.acidophilus*, *L.casei* и *L. Plantarum*.

Штамм бактерий *L.acidophilus* N.V.EP 317/402 "НАРИНЭ" ТНСи, используемый при приготовлении лечебно-профилактических препаратов для нормализации кишечной микрофлоры, относится к биотехнологии и касается штамма лактобацилл, обладающего способностью продуцировать интерферон в одноклеточных клетках человека, влиять на физиологические и иммунологические процессы в организме.

Штамм *Lactobacillus acidophilus* N.V.EP 317/402 "Наринэ" ТНС депонирован в ВКПМ под В-8017. Получен путем многолетней селекции исходной культуры *L.acidophilus* N.V. 317/402 "Наринэ" – того самого, который был открыт и разработан, а позже и подробно исследован ещё в СССР – в Армении. (Автор *Lactobacillus acidophilus* N.V.EP 317/402 "Наринэ"-Левон Ерзинкян). Штамм *Lactobacillus acidophilus* N.V.EP 317/402 "Наринэ" ТНС отобран по антибиотической активности к возбудителям желудочно-кишечных заболеваний, антибиотико-резистентности, витаминообразующей способности, скорости роста и т.д.

Современные пробиотики можно разделить на две группы в зависимости от технологии их производства.

1. **Первая** группа пробиотиков производится с использованием метода лиофильной сушки субстрата живых активных клеток. Препараты выпускают в форме порошка, таблеток, капсул или свечей. Эти формы имеют длительные сроки годности (до 1 года) и нетребовательны к непродолжительным изменениям температуры хранения. Существенным их недостатком является то, что процесс лиофилизации переводит бактерии в анабиоз (неактивное состояние). Для возвращения в активное физиологическое состояние им требуется 8-10 часов, а за это время большая часть бактерий уже выводится из кишечника человека. Кроме того, в процессе лиофилизации бактериальные клетки теряют специфические рецепторы, которые помогают им закрепляться на поверхностях, поэтому время их пребывания в кишечнике еще более снижается.

2. При производстве **второй** группы – жидких пробиотиков – микробные клетки остаются в активном состоянии и способны к колонизации желудочно-кишечного тракта уже через 2 часа после попадания в организм. Жидкие формы препаратов содержат дополнительный лечебный фактор – продукты метаболизма активных форм живых бактерий. Среди них очень важны низкомолекулярные жирные кислоты, которые улетучиваются при лиофилизации.

Технология приготовления сухого бактериального препарата Бифиформ

Основные этапы:

- выращивание заквасочных микроорганизмов,
- бактофугирование полученной культуры,
- высушивания суспензии клеток,
- фасовки бакконцентрата.

Культивирование бактерий проводят в биореакторах. После проверки на герметичность и обработки фильтров биореактор стерилизуют при 130° С в течение 90 мин. Затем в него вводят гидролизатно-молочную среду или азидно-глюкозный бульон. Стерилизация и охлаждение питательной среды, а также наращивание клеток молочнокислых бактерий осуществляются в ферментере, имеющем мешалку, в котором автоматически регулируются температура и рН на заданном уровне.

В подготовленную стерильную среду, охлажденную до оптимальной температуры развития (*Enterococcus faecium* – 37°С, *Bifidobacterium longum* – 38°С), подают закваску в количестве 5-8%. Засев питательной среды проводят бифидобактериями 2 - 3-й генерации. Наращивание клеток *Enterococcus faecium* ведут в ферментере при температуре 37°С в течение 20-22 ч, *Bifidobacterium longum* – при 38°С в течение 16-17 ч. при автоматической поддержке рН. При этом рН культуральной жидкости достигает для энтерококков 6,0, для бифидобактерий – 6,7-6,8.

После культивирования проводят контроль биомассы. Биологическая концентрация бифидобактерий должна быть не менее 10⁸ клеток / мл, посторонняя микрофлора должна отсутствовать, рН должно быть на заданном уровне.

После этого культуру охлаждают до 3-8°C и направляют на бактофугирование для получения бактериальной массы.

Отделение клеток от среды осуществляют в конце логарифмической фазы роста, когда в культуральной жидкости (в 1 см³) содержатся сотни миллионов - единицы миллиардов активных клеток. Затем выделяют бактериальную массу из культуральной жидкости. Для этой цели можно использовать центрифугу и молокоочиститель.

Бактериальная масса содержит сотни миллиардов клеток в 1 см³, выход биомассы составляет 0,5-0,8%. Полученную бактериальную массу смешивают с защитной средой в соотношении 1: 2 - 1: 4. В состав защитной среды для *Enterococcus faecium* входят обезжиренное молоко с содержанием 16% сухих веществ, 30 и 70% водного раствора, содержащего сахарозу (5%), желатозу (5%), цитрат натрия (5%), глутамат натрия (2%). В состав защитной среды для *Bifidobacterium longum* вместо цитрата натрия вносят 5% уксуснокислого натрия.

Желатоза является желатином после стерилизации под давлением 0,15 МПа в течение 2,5-3,0 часа. После стерилизации желатин теряет способность образовывать гель.

Биомассу со средой высушивания перемешивают $3 \pm 0,5$ мин механической мешалкой, разливают в стерильные емкости и передают на участок разлива в ампулы по 2 см³ или разливают в лотки слоем 6-8 мм.

Разлив биомассы в ампулы проводится при постоянном перемешивании. В начале, середине и конце разлива отбирают пробы для определения посторонней микрофлоры и жизнеспособности бифидобактерий, равномерности и точности разлива. Заполненную ампулами кассету прикрывают несколькими слоями стерильной марли, металлической крышкой и передают для замораживания в низкотемпературную установку, где выдерживают препарат при температуре $-40 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 48 ± 2 часа.

Высушивание проводят при давлении $13,3 \pm 0,13$ Па, температуре $-30 \pm 4^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч., далее температуру повышают до $+28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 16 ± 2 ч. и выдерживают 20 ± 2 ч. Продолжительность сушки суспензии на лотках – 6-12 ч.

После окончания процесса сушки производится запайка ампул. Герметизацию ампул осуществляют не позднее 72 ч. после

окончания лиофилизации на автомате для запайки ампул в атмосфере азота. Сухой бактериальный концентрат, высушенный на лотках, измельчают и определяют титр.

Концентрат должен содержать от 150 до 300 млрд клеток в 1 г. Массовая доля влаги в нем не должна превышать 3,5%. Допускается наличие посторонней непатогенной микрофлоры не более 10 клеток в 1 г. После этого культуры *Bifidobacterium longum* и *Enterococcus faecium* смешивают и фасуют в капсулы порциями по 1-1,5 г. Закупорку сухих биопрепаратов по причине их гигроскопичности проводят под вакуумом или в токе инертного газа. В помещении контроля проводят проверку герметичности капсул и визуальный контроль.

Капсулы, прошедшие контроль и досмотр, отправляют на маркировочную машину, затем укладывают по 30 штук в пачки из картона. В каждую пачку укладывается инструкция по применению препарата. На каждой единице потребительской тары нанесена маркировка с указанием следующих информационных данных: наименование предприятия-изготовителя, его адрес, товарный знак, наименование продукта; массовая доля жира в процентах; состав продукта, масса нетто в граммах, условия хранения, срок годности, дата изготовления; обозначение ТУ; пищевая и энергетическая ценность продукта; штрих-код, содержание в продукте живых бифидобактерий не менее 10^7 клеток в 1 см^3 на конец срока годности; общее содержание в продукте молочнокислых микроорганизмов на конец срока годности - не менее 10^7 клеток в 1 см^3 ; информация о сертификации.

Тара и упаковочные материалы, применяемые для разлива и упаковки, соответствующие требованиям действующих стандартов. Упакованный в транспортную тару продукт доохлаждают в холодильной камере до температуры не более 6°C , после чего технологический процесс считается законченным.

После охлаждения в камере продукт считается готовым. Срок хранения готового продукта при температуре $3-10^{\circ}\text{C}$ – 8 месяцев со дня изготовления.

Наращивание клеток в условиях непрерывного культивирования предполагает постоянный приток питательной среды и одновременное удаление продуктов жизнедеятельности. В результате этого микроорганизмы приобретают способность к продуктивному не затухающему во времени росту, что дает возможность получить закваску и бактериальный концентрат, а

также увеличить выход продукции из существующего оборудования.

Технология изготовления пробиотиков АВИЛАКТ-1К и АВИСТИМ

Штаммы-продуценты получают селекцией по заданным свойствам или выбирают в коллекции промышленных микроорганизмов в соответствии с определенными требованиями (имеется Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика). Для производства препаратов берут: лактобактерии *L. acidophilus* (группа симбионтов), штамм 1К (ВКПМ № В-2991); бактерии *Bacillus subtilis* (транзиторная группа), штамм М-8 (ВКПМ №: В-3121); дрожжи *Saccharomyces cerevisiae diastaticus* (ВКПМ-γ-1218). Для получения пробиотика используют выделенный новый штамм высшего лечебного гриба *Fusarium sambucinum* шт. МКФ 2001-3

Изготовление и контроль посевного материала

Согласно современным требованиям (ГОСТ Р 52249-2009, ГОСТ Р 2001-2008) разработка системы изготовления и методов контроля посевного материала, используемого в технологическом процессе производства биопрепаратов, является обязательным условием обеспечения их качества.

Реализация стандартной процедуры изготовления и контроля посевного материала позволяет:

- 1) гарантировать идентичность исходному штамму характеристик и свойств материала, используемого для изготовления конечного продукта;
- 2) разработать методы контроля безопасности, активности и стабильности препарата;
- 3) включить данную процедуру в виде самостоятельного документа в технологические регламенты производства.

Система посевных материалов (Seed lot system, S.l.s.) – это технологическая система, в которой последовательные серии промежуточных продуктов (вирусной или микробиологической природы) получают посредством установленного количества пересевов (пассажей). Она состоит из главного (Master seed, M.s.), рабочего (Working seed, W.s.) и производственного посевного материала (Production seed, P.s.), предназначенного только для производства серии конечной продукции. Последовательность

получения посевного материала: Master seed → Working seed → Production seed.

Микроорганизмы выбранных штаммов-продуцентов культивируют в соответствии с условиями, указанными в паспорте на данный штамм. Полученные культуры контролируют микроскопированием на отсутствие посторонней микрофлоры и подлинность (культурально-морфологические признаки), стабилизируют путем сублимационного высушивания с защитной средой ОМ (M.s. - в ампулах по 1 см³, W.s. - в пенициллиновых флаконах по 2 см³).

Готовый посевной материал контролируют по показателям подлинности, безопасности и активности.

Для характеристики безопасности определяют: контаминацию посторонней бактериальной и грибковой микрофлорой, безвредность для цыплят суточного возраста и токсичность для развивающихся SPF-эмбрионов кур (РЭК) с использованием теста эмбриотоксичности. Активность пробиотиков оценивают по количеству жизнеспособных бактерий, антагонистической активности *in vitro*, резистентности к антибиотикам.

Культивирование бактерий – пробиотиков *L. acidophilus* и *B. subtilis*. Посевной материал (P.s.) для культивирования бактерий в реакторе получают из рабочей посевной серии (W.s.) при выращивании в колбах с питательной средой на основе молочной сыворотки (МС) или ферментолизата отходов зерносырья (ФЗ).

Состав среды МС: сухая молочная сыворотка – 30г; (NH₄)₂SO₄ – 0,05г; КН₂РО₄ – 0,03г; дрожжевой автолизат – 0,01дм³; вода водопроводная – 1,0 дм³. Характеристика среды после стерилизации (0,5 атм 30 мин.): редуцирующих веществ (РВ) – 1,6%; NH₄ – 0,9 г/ дм³; Р₂О₅ – 0,5 г/ дм³.

Состав среды ФЗ: (NH₄)₂SO₄ – 0,05г; КН₂РО₄ – 0,02 г; дрожжевой автолизат – 10 см³; мел – 3 г; ферментолизат отходов зерносырья – 1,0 дм³. Среду стерилизуют при 1 атм. в течение 40 минут. Для получения ферментолизата смесь измельченной ржи и пшеничных отрубей (в соотношении 30:70) разбавляют водой (гидромодуль 1:6 или 1:8) и подвергают последовательно: термообработке при температуре (80±1)°С в течение 1 часа; обработке в роторно-пульсационном аппарате при температуре (75±1)°С в течение 40 мин.; ферментализу зерновой пульпы

глюкавамарином ГЗХ при температуре $(55\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 4 часов при pH 5,0-5,2. Среду стерилизуют при 1 атм 40 мин. Характеристика среды после стерилизации: редуцирующих веществ РВ – 2,5-3,0%; NH_4 – 0,9 -1,0 г/ дм³; P_2O_5 – 0,4-0,5 г/дм³.

Бактерии *L. acidophilus* культивируют в термостате при температуре $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 70-72 ч. при периодическом перемешивании (каждые 12 ч.), *B.subtilis* – на качалке ($g=200$ об/мин) при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 40-48 ч. После окончания процесса состояние каждой культуры контролируют микроскопированием на отсутствие посторонней микрофлоры и соответствие культурально-морфологическим признакам, определяют накопление клеток.

Полученный посевной материал используют для культивирования бактерий в биореакторе ($V=30$ и 300дм^3).

Режим культивирования *L. acidophilus* в реакторе: количество Р.с. составляет 8-10% от объема питательной среды ФЗ; температура – $31-32^\circ\text{C}$, время – 20-24 ч.; перемешивание в течение первых двух часов (по 15 минут в час, $g=180$ об/мин.); начальное значение pH – 7,0-7,2; при культивировании pH поддерживают на уровне 6,5-7,0 (6%-ной аммиачной водой). Конечная концентрация сухих веществ в биомассе - 10,0-12,0 г/дм³; концентрация сахаров в среде снижается до 0,2%. Накопление лактобактерий – не менее 5×10^9 КОЕ/см³. Режим культивирования *B.subtilis*: объем посевного материала – 5-6%; температура – $37-38^\circ\text{C}$, время 36-48 ч.; перемешивание мешалкой (300 об/мин); аэрация (1 дм³ воздуха/1 дм³ среды/мин.); начальное значение pH 7,0-7,2, в процессе культивирования не регулировалось. Конечная концентрация бактерий – 1×10^{10} – 1×10^{11} КОЕ/см³, количество спор – 30-50%.

Состояние культур бактерий контролируют микроскопированием.

Изготовление готовых форм препаратов. Для пробиотиков разработаны две готовые формы – жидкая и сухая. После культивирования и контроля качества продукт в первом случае фасуют в первичную тару и укупоривают, во втором – фасуют в кассеты и подвергают сублимационному высушиванию. Количество живых бактерий в сухом материале составляет не менее 3×10^9 КОЕ/г и 1×10^{11} КОЕ/г соответственно для *L. acidophilus* и *B. subtilis*. Жидкий препарат расфасовывают в стеклянную или полиэтиленовую тару, предназначенную для лекарственных

средств и пищевых продуктов. Сухой препарат расфасовывают в полимерные пакеты.

Технология производства пребиотика АВИСТИМ.
Культивирование гриба *F. sambucinum*. Посевной материал (P.s) получают культивированием в колбах со средой МС или ФЗ при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$ на качалке ($g=160$ об/мин). Время культивирования пассажей: первого – 96 часов, второго – 48 часов, третьего и последующих – 24 часа. Контролируют микроскопированием состояние культуры, определяют накопление биомассы - $5-6$ г/дм³ (одинаковое для обеих сред) и используют для культивирования в биореакторе при следующих параметрах: объем P.s. - 2-4%; температура - $27 \pm 2^\circ\text{C}$; время – 30-34 часа; перемешивание постоянное ($g=120$ об/мин.); барботаж воздухом (при 1,1 атм); остаточное давление 0,25 атм; начальное значение рН 5,5-6,0; процесс заканчивали при снижении рН до $4,1 \pm 0,5$. Через 12 часов после начала процесса отбирают пробы (1 раз каждые 3 часа) для определения рН среды, концентрации биомассы, контроля состояния мицелия. После окончания процесса культуральную среду подкисляют до рН 3,0-3,5 и выдерживают в течение 1-3 часов. Концентрация биомассы составляет 10-12 г/дм³, содержание белка – 46-53%.

Получение готовой формы препарата. КЖ отделяют от биомассы фильтрацией на нутч-фильтрах (фильтрующая ткань типа лавсана, разрежение 0,05-0,07 МПа, скорость – 90-110 л/м²/мин.), подвергают стерилизующей фильтрации и расфасовывают в стеклянную или полиэтиленовую тару.

Технология получения бакконцентратов молочнокислых бактерий

Бактериальные концентраты представляют собой специально подобранные и подготовленные комбинации молочнокислых бактерий.

Наибольшее применение для их производства нашел метод сублимационного (лиофильного) высушивания бактериальной массы, так как он позволяет добиться высокого содержания жизнеспособных микроорганизмов и хорошей их выживаемости при хранении, кроме того, сухие бактериальные концентраты удобны для транспортировки на предприятия молочной отрасли.

Сублимационная сушка молочнокислых микроорганизмов осуществляется при первоначальном замораживании бактериальной

массы до температуры $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, так как при этой температуре около 96% влаги находится в твердом агрегатном состоянии.

Однако исходя из материалов научно-технической литературы, более высокой выживаемости микроорганизмов можно добиться при мгновенном замораживании в среде жидкого азота при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. При сверхбыстром охлаждении вода не успевает выйти из клетки, что уменьшает ее обезвоживание, структура льда становится более мелкокристаллическая, уменьшается время действия гиперконцентрированных растворов солей. Повреждения, вызванные воздействием мелких кристаллов льда, не вызывают гибели клетки.

Для увеличения выживаемости микроорганизмов при замораживании используют защитные среды, содержащие криопротекторы, т.е. вещества, обладающие способностью предупреждать развитие криповреждений биообъектов и обеспечивать их сохранность в жизнеспособном состоянии после замораживания. В качестве криопротекторов используют: углеводы (глюкоза, фруктоза, лактоза, сахароза и др.), белки (альбумин, желатина), аминокислоты (аланин, валин, глицин и др.), полимеры (декстран), неорганические соли (NaCl , MgCl_2 и др.) Криопротекторными свойствами обладают также сухое обезжиренное молоко, пептон, сыворотка и другие вещества.

При сушке замороженной биомассы происходит целый комплекс явлений, которые влияют на выживаемость микроорганизмов. Необходимость сохранения белков обусловлена их главной ролью в процессе жизнедеятельности микроорганизмов. Денатурация белков и инактивация ферментов являются причинами гибели клеток. Большую опасность для молочнокислых бактерий при обезвоживании представляют минеральные вещества, содержащиеся в клетке в виде электролитов. В процессе обезвоживания их концентрация повышается и может достигнуть уровня, при котором белок денатурируется. При сушке также может изменяться реакция среды или повышаться до сверхдопустимой величины концентрация токсичных компонентов, что понижает жизнеспособность микроорганизмов непосредственно в процессе обезвоживания или вызывает их быструю гибель при хранении.

Скорость сушки лимитируется не только внешним, но и внутренним тепло- и массопереносом. Так как при испарении льда зона парообразования углубляется в толщу продукта, образующийся сухой слой оказывает сопротивление как

проникновению пара из зоны парообразования к поверхности материала, так и передаче тепла извне к зоне сублимации. Таким образом, слой подсохшего материала оказывает гидродинамическое и термическое сопротивление, величина которого возрастает по мере увеличения толщины самого слоя. Одним из способов ликвидации отрицательного влияния сухого слоя при сублимационном высушивании является гранулирование продукта: биомассу мезофильных лактококков смешивают со стерильной защитной средой в соотношении 1:1. В качестве защитной среды используют две части 10% сахарозы и 5% натрия лимоннокислого и одну часть 14% сухого обезжиренного молока.

Полученную суспензию замораживают, затем высушивают методом сублимации в течение 26–27 ч., постепенно увеличивая температуру от –40 до 30 °С.

Гранулирование микробной массы молочнокислых микроорганизмов позволяет увеличить количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 г концентрата, сократить время высушивания до достижения необходимой влажности продукта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.Винаров А.Ю., Гордеев Л.С., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Ферментационная аппаратура для процессов микробиологического синтеза / под ред. В.А. Быкова.- М., 2005.- 278 с.

2.Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов. - Т. I, П. - М.: РАСХН, 2000.

3.Тихонов И. В. Практикум по биотехнологии /И. В. Тихонов, В. А. Гаврилов, Д. А. Девришов (и др.).- М.: «Киселева Н. В.», 2010.-329 с.

4.Тихонов КВ., Рубан Е.А., Грязнева Т.Н., Самуйленко А.Я., Гаврилов В. А. Биотехнология: Учебник / Под ред. акад. РАСХН Е.С. Воронина. - СПб: ГИОРД, 2005.