

Изобретение относится к биотехнологии, в частности касается получения сухого бациллярного препарата субтилис, используемого для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных.

Цель изобретения - повышение качества и выхода целевого продукта, увеличение срока его хранения.

Для получения препарата используют штамм бактерий *Bacillus subtilis* 44-Р. Штамм отобран среди штаммов, выделенных из содержимого рубца крупного рогатого скота, по культурально-морфологическим признакам, отсутствию токсичности и патогенности для лабораторных и домашних животных при применении внутрь и парентеральном введении, способности к глубинному росту.

Штамм *Bacillus subtilis* 44-Р депонирован в Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов и имеет регистрационный номер В-4099. Штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ № В-4099 характеризуется следующими свойствами.

Культурально-морфологические особенности штамма. Грамположительные спорообразующие палочки с закругленными концами, подвижные. На агаризованной картофельно-минеральной среде при температуре 37°С выращивания колонии через 18-20ч роста слизистые, блестящие, округлой формы, возвышенные, через 24-48ч роста складчатые, матовые с приподнятым центром и зазубренными краями, бесцветные или беловатого цвета,

На поверхности жидких сред образует тонкую пленку, под пленкой столбик среды прозрачный, обладает способностью к глубинному росту.

Ферментирует глюкозу, мальтозу, сахарозу и маннит.

Активно продуцирует каталазу, ацетилметилкарбинол.

При сбраживании углеводов накапливает до 95% молочной кислоты. Гидролизует крахмал.

Отношение к фагам, лизирующим клетки других штаммов того же вида микроорганизмов. Фагоустойчивый. Генетические особенности (ауксотрофность, устойчивость к антибиотикам и т.д.).

Ауксотрофностью не обладает, устойчив к мономицину и стрептомицину, чувствителен к левомицетину и тетрациклину.

Условия и состав сред для хранения штамма.

В лиофильно высушенном виде или на агаризованной среде при температуре 3 - 5°С. Состав среды: 20%-ный картофельный отвар 1л; (NH₄)₂HPO₄ 5,0г; K₂HPO₄ 2,0г; MgSO₄ 0,1г; агар-агар 20,0г.

Способ приготовления картофельного отвара.

Для отвара используют тщательно промытый неочищенный картофель, режут ломтиками величиной 2-3см и варят до готовности. Отвар фильтруют в остывшем виде через 4 слоя марли и вносят остальные компоненты согласно прописи. рН среды доводят до 7,0-7,2, стерилизуют 30мин при 1кгс/см².

Условия и состав сред для размножения штамма. Выращивание в колбах при температуре 37°С в течение 5-8 сут. на среде такого состава, г:

Кукурузный экстракт	20
Меласса	20
Крахмал	5
Аммоний фосфорнокислый трехзамещенный	5
Калий фосфорнокислый двухзамещенный	2
Магний сернокислый	0,1
Вода водопроводная, мл	1000

Условия и состав сред для ферментации. Выращивание в ферментерах с перемешиванием и аэрацией при температуре 37°С в течение 36ч на жидкой питательной среде.

Максимальная и средняя активности (продуктивности) штамма, а также производственные показатели штамма. В 1г сухого бациллярного препарата субтилис содержится не менее 5 млрд. жизнеспособных клеток.

Способ определения активности (продуктивности) штамма с указанием метода.

Чашечный метод. Метод основан на приготовлении ряда последовательных разведении 1г препарата в стерильной водопроводной воде с высевом в агаризованные среды с крахмалом в чашки Петри, с последующим подсчетом выросших колоний.

Типичность выросших колоний штамма определяют по культурально-морфологическим признакам и йодной пробой. При внесении капли йодного раствора колонии дают бесцветную зону.

Приготовление йодного раствора.

В 100мл воды растворяют 20г йодистого калия, 10г йода. Для реакции раствор разбавляют в 5 раз водой.

Пример 1. 100л питательной среды готовят и стерилизуют дробно:

Одна часть, мас. %:

Вода хозяйственная	40,0
CaCO ₃	0,06
α-амилаза	0,15
Крахмал картофельный или кукурузный	15,0

При температуре 75°С ± 2 и перемешивании проводят гидролиз крахмала.

После окончания гидролиза крахмала добавляют, мас. %:

K ₂ SO ₄	0,5
MgSO ₄	0,03
NaCl	0,06

Другая часть, мас. %:

Вода хозяйственная	40,0
--------------------	------

БВК	0,4
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,5
Кукурузный экстракт	2,0

Части соединяют и корректировку pH проводят 20%-ным стерильным раствором NaOH до значения 6,6-6,8.

Биохимические показатели приготовленной питательной среды:

Сухие вещества по Балингу, °	11-13
pH	6,6-6,8
Глюкоза, %	3,5-4
Азот аминный, мг/%	25 - 30

Затем вносят 0,01% к объему среды, взвесь чистой культуры *B. subtilis* ВКПМ № В-4099. Культивирование ведут лубинно в течение 28ч при температуре 37°C±1, непрерывном перемешивании и аэрации стерильным воздухом с расходом 0,1 V/V.

Титр клеток составляет 2,4 x 10⁹ кл/мл.

Бактериальную массу отделяют от нативного раствора суперцентрифугированием при 12600 g (15000 об/мин). Полученную влажную биомассу смешивают в соотношении 1:1 с защитной средой состава, мас. %:

Сахароза	5-10
Натрий уксуснокислый	1-2
Вода хозпитьевая	Остальное

Полученную пасту высушивают сублимационно. Выход 495г сухого продукта с титром жизнеспособных клеток *B. subtilis* ВКПМ № В-4099 42 x 10⁹ кл/г, что соответствует выходу целевого продукта 8,7% от культуральной жидкости (табл. 1).

В табл. 1 приведены усредненные результаты по трем сериям опытов. Из данных табл. 1 видно, что при получении биомассы препарата предлагаемым способом значительно интенсивней идет накопление количества клеток в культуральной жидкости, повышается выход жизнеспособных клеток после высушивания сырой биомассы с наполнителем, и в 2-3 раза увеличивается их сохранность при хранении в течение 12-15 месяцев.

Пример 2. Влияние количественного соотношения компонентов среды определяют по титру жизнеспособных клеток в культуральной жидкости. Культивирование проводят глубинно при температуре 37°C±1 в течение 28ч, перемешивании и аэрации 0,1 V/V.

Данные приведены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что снижение количества (меньше чем в варианте 1) компонентов среды ведет к уменьшению выхода жизнеспособных клеток, это отразится на количестве конечного продукта, а при их увеличении (больше, чем в варианте 3) отмечен незначительный рост числа клеток, хотя расход таких ценных компонентов среды, как крахмал, БВК и кукурузный экстракт резко увеличивается, что способствует удорожанию препарата.

Пример 3. При подготовке микробных клеток к лиофилизации было изучено влияние защитной среды, состоящей из сахарозы и натрия уксуснокислого в различных концентрациях (табл. 3).

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что снижение количества сахарозы и натрия уксуснокислого меньше чем в 1 варианте приведет к снижению титра жизнеспособных клеток в готовом препарате, что наблюдается и при их увеличении больше чем в 3 варианте. Выход жизнеспособных клеток без применения защитной среды ниже почти в 2 раза.

Пример 4. Было изучено влияние различных количеств подаваемого в ферментер воздуха для аэрации (0,08, 0,1, 0,2, 0,4 объемов среды) на выход жизнеспособных клеток в культуральной жидкости, что показано в табл. 4.

Как видно из представленных в табл. 4 данных, оптимальным количеством подаваемого воздуха в ферментер при накоплении биомассы *B. subtilis* ВКПМ В-4099 является 0,1 объем воздуха на объем питательной среды в течение всего периода выращивания. Повышение его количества снижает выход жизнеспособных клеток в культуральной жидкости.

Таким образом, способ позволяет повысить качество и выход готового продукта, увеличить срок хранения и снизить себестоимость препарата.

Таблица 1

Сравнительная эффективность известного и предлагаемого способа получения сухого бациллярного препарата

Полученный сухой препарат	Титр жизнеспособных клеток		Выход готового продукта, %	Сохранность жизнеспособных клеток <i>Bacillus subtilis</i>			БКПМ В-4099
	в культуральной жидкости, кл/мл	в сухом препарате, кл/г		6 мес.	9 мес.	12 мес.	15 мес.
По известному способу	0,3*10 ⁸	1*10 ⁹	6,8	100	56,8	47,4	23,6
По предлагаемому способу	2,4*10 ⁹	42*10 ⁹	8,7	100	51,3	84,7	66,9

Таблица 2

Влияние количественного соотношения компонентов среды на накопление биомассы бациллярного препарата субтилис в культуральной жидкости

Компоненты среды, показатель	Количественное соотношение компонентов среды, %, значение показателя, вариант			
	1	2	3	4
Крахмал картофельный или кукурузный	10,0	12,0	15,0	17,0
α -амилаза	0,1	0,12	0,15	0,17
БВК	0,2	0,3	0,4	0,5
Кукурузный экстракт	1,0	1,5	2,0	2,5
Калий сернокислый	0,2	0,4	0,5	0,6
Аммоний фосфорнокислый двузамещенный	1,0	1,3	1,5	1,7
Магний сернокислый	0,01	0,02	0,03	0,04
CaCO_3	0,02	0,04	0,06	0,08
NaCl	0,02	0,04	0,06	0,08
Вода	Остальное			
Количество жизнеспособных клеток в 1 мл культуральной жидкости	$2,0 \cdot 10^9$	$2,2 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$

Таблица 3

Влияние различных количеств компонентов защитной среды на выход жизнеспособных клеток в лиолизированном бациллярном препарате

Компоненты защитной среды, показатель	Количественное соотношение компонентов защитной среды, %, значение показателя, вариант			
	1	2	3	Контроль без внесения защитной среды
Сахароза	5,0	10,0	15,0	-
Натрий уксуснокислый	1,0	2,0	3,0	-
Вода	94,0	88,0	82,0	-
Выход жизнеспособных клеток бациллярного препарата после лиофилизации в 1г	$38 \cdot 10^9$	$42 \cdot 10^9$	$41 \cdot 10^9$	$24 \cdot 10^9$

Таблица 4

Влияние количества подаваемого в ферментер воздуха на выход жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis*, шт. 44-Р в культуральной жидкости

Количество воздуха подаваемого в ферментер, объемов на объем среды в час	Время культивирования, ч	Количество клеток в 1 см ³ культуральной жидкости
0,08	28	$2,1 \cdot 10^9$
0,10	28	$2,4 \cdot 10^9$
0,20	28	$2,0 \cdot 10^9$
0,40	28	$1,6 \cdot 10^9$