

8. A.R. Costa-Pinto, R.L. Reis, N.M. Neves. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. Review // Tissue Eng. Part B Rev. 2011. Vol. 17, N 5. P. 331–347.
9. R. Spin-Neto, F.L. Coletti, R.M. de Freitas, C. Pavone, S.P. Campana-Filholo, R.A.C. Marcantonio. Chitosan-based biomaterials used in critical-size bone defects: radiographic study in rat's calvaria // Rev. Odontol. UNESP. 2012. Vol. 41, N 5. P. 312317.
10. Патент РФ № 2309748 «Способ лечения пародонтита при инсулинозависимом сахарном диабете препаратом «ХАГ-БОЛ» / Тумшевиц О.Н., Большаков И.Н., Зыкова Л.Д., Белоусова Ю.Б., Тумшевиц В.О., опубликован 10.01.2006, бюл.31.
11. D.W. Dempster, J.E. Compston, M.K. Drezner, F.H. Glorieux, J.A. Kanis, H. Malluche, P.J. Meunier, S.M. Ott, R.R. Recker, A.M. Parfitt. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee // J. Bone Miner. Res. 2013. Vol. 28, N 1. P. 2–17.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

**П.А. Красочко¹, А.И. Албулов², М.А. Фролова², И.А.Красочко¹,
В.И.Еремец², Э.И. Зелинская², В.П. Варламов²**

¹ Учреждение образования «Витебская государственная академия ветеринарной
медицины», Витебск, Республика Беларусь

² Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности, Щелково, Московской области, Российская Федерация
E-mail: info@bioprogress.ru

Аннотация. Цель исследования – отработать способ концентрирования культуральной массы бацилл после реакторного культивирования с использованием хитозана для изготовления пробиотиков. Использование высокомолекулярного хитозана ММ 500 при концентрации 0,25% отмечается концентрирование в 1000 раз (с 10^9 до 10^{12} КОЕ/мл, при использовании 0,5% раствора хитозана установлена концентрирование бактерий в 100 раз с 10^9 до 10^{11} КОЕ/мл. Таким образом установлено, что с помощью высокомолекулярного хитозана возможно провести концентрирование бацилл в 100–1000 раз, что имеет перспективу для получения и использования бациллярных препаратов как в ветеринарии (в качестве ветеринарных препаратов), так и в животноводстве (в качестве кормовых добавок).

Ключевые слова: хитозан, бациллы, концентрирование, пробиотики.

Введение

Вопрос концентрирования и очистки бактерий после культивирования реакторным способом является проблемой в биотехнологическом производстве. Особенно это касается жидких пробиотиков на основе бацилл. Бациллярные пробиотики имеют одно важное свойство – при переходе вегетативной формы микроорганизма в спорую сохраняется длительность его хранения в жидком виде. Но при реакторном культивировании концентрация микроорганизмов часто не достигает желаемой концентрации – реально можно получить 2–3 млрд микробных тел в мл. При такой концентрации для транспортировки и хранения

препаратов следует увеличить их концентрацию до 8–10 млрд. микробных тел в мл. Для этого необходимо провести концентрирование бактериальной массы.

Имеется ряд технологических приемов концентрирования

– центрифугирование в обычных центрифугах с использованием стаканов различного объема;

– центрифугирование с использованием сепараторных центрифуг;

– тепловая коагуляция белков;

– флокуляция;

– сорбция с использованием целлюлозы или полиакриламида и т.д.

В последние годы одним из перспективных методов концентрирования бактерий из культуральной суспензии бактерий является использование высокомолекулярного хитозана.

Хитозан – линейный полисахарид – производное природного биополимера – хитина, второго (после целлюлозы) по распространенности в природе органического вещества. Хитозан – основное производное хитина – получают промышленным способом путем химического или ферментативного деацетилирования хитина. В зависимости от условий реакции получают хитозаны, обладающие различной молекулярной массой и различной степенью деацетилирования. Запасы хитина биологически возобновляются и практически неисчерпаемы. Он входит в состав опорных тканей и внешнего скелета ракообразных (крабы, креветки, омары и т.п.), насекомых, оболочек клеток микроорганизмов, некоторых грибов и водорослей. Только морские ракообразные синтезируют его 10 млрд тонн в год. Хитозан является единственным природным катионным полисахаридом. Это придает ему особые свойства, объясняющие его применение во многих сферах

История исследований хитина и хитозана насчитывает около 200 лет. Хитин был открыт в 1811 году, а хитозан в 1859 году. В первой половине XX века к хитину и его производным был проявлен заслуженный интерес, в частности к его исследованию имели непосредственное отношение три Нобелевских лауреата: E. Fischer (1903) синтезировал глюкозамин, P. Karrer (1929) провел деградацию хитина с помощью хитиназы и, наконец, W.N. Haworth (1939) установил абсолютную конфигурацию глюкозамина.

До 1970 года по всем странам было опубликовано 78 патентов (кроме этого есть большое количество закрытых патентов), связанных с хитином и хитозаном. На сегодняшний день количество патентов, полученных по данной теме в мире, достигает 5000. Такое внимание к практическому использованию хитина и его производных обусловлено их уникальными свойствами, дающими большой положительный эффект в самых различных отраслях. В настоящее время известно более 100 областей применения хитозана и композиций на его основе.

Уникальные свойства биополимеров – хитина и его производных (высокая сорбционная способность, биосовместимость, биodeградируемость, нетоксичность, бактерицидность и др.) – и неисчерпаемые запасы сырья (панцири морских и пресноводных ракообразных, грибы, покровы насекомых) обуславливают все возрастающий интерес к их производству и практическому применению.

Цель исследования – отработать способ концентрирования культуральной массы бацилл после реакторного культивирования с использованием хитозана для изготовления пробиотиков.

Материалы и методы исследований

Исследования проводились на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней, отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО

«Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», ООО «Биопрогресс».

Для работы использован высокомолекулярный хитозан ММ 500, Степень деацетилирования 87 %, изготовленный в условиях ООО «Биопрогресс» (Щелково, Российская Федерация).

Бактериальную массу спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454 Д, полученный путем глубинного культивирования бактерий получали виз биотехнологического центра ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». Титр бактерий – 3×10^9 КОЕ/мл

Для концентрирования бацилл на первом этапе проводили растворение хитозана ММ 500 в 1 % раствор уксусной кислоты. Для этого готовили его 2 % раствор. Растворение проводила с использованием 1% раствора уксусной кислоты, которую готовили путем смешивания 10 мл ледяной уксусной кислоты и 990 мл дистиллированной воды. К раствору кислоты добавляли 20 г хитозана ММ 500, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 1 сутки

Далее в суспензию бацилл добавили 2% раствор хитозана ММ 500:

Для получения 0,25% концентрации – на 1 часть раствора хитозана ММ 500 добавили 7 частей бацилл;

Для получения 0,5 % концентрации – 1 часть раствора хитозана ММ 500 добавили 3 части сальмонелл;

При контроле рН должно быть от 5,0 до 6,0. Если рН идет в щелочную сторону – довести уксусной кислотой

Для контроля рН- использовать индикатор (фенолфталеин или феноловый красный) при кислой рН – фенолфталеин прозрачный, а феноловый красный – желтый; при щелочной рН – фенолфталеин и феноловый красный – малиновые

После тщательного перемешивания через 2–3 часа довести рН с помощью 10 % раствора едкого натра (NaOH) до 8,0. Смесь оставить на 24 часа в стеклянном цилиндре при $+2+4^{\circ}\text{C}$.

Через 24 часа должен образоваться плотный осадок хитозана с бациллами.

После контакта осадок отделить от надосадка и дальнейшую работу проводить как с осадком, так и с надосадком.

Для определения концентрация бактерий осадок его ресуспендировали в изотоническом растворе натрия хлорида. Для этого готовили разведения от 10^1 до 10^{12}

С надосадком также проводили разведение от 10^1 до 10^{12} .

С разведениями надосадка и осадка концентрацию бацилл будем определять путем посева на МПА.

Результаты исследований

При проведении исследований по концентрированию бацилл из культуральной жидкости с помощью хитозана были получены следующие результаты.

После внесения в культуральную жидкость растворенного хитозана отмечено равномерное смешивание без разделения на фракции.

Через 3 часа после внесения хитозана и тщательного перемешивания в реакционную смесь добавили 10% раствор едкого натра (NaOH) с доведением рН до 8,0–8,5. Сразу после доведения рН до 8,0–8,5 отмечено образование хлопьев хитозана, на который сорбировались бациллы. Смесь оставили на 24 часа в стеклянном цилиндре при $+2+4^{\circ}\text{C}$. Через 24 часа после

осаждения хлопьев надосадочная жидкость была прозрачной, а осадок составлял 10-ю часть от исходной концентрации.

При высеве разведений надосадка и осадка получены следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1

Титр бацилл при концентрировании их хитозаном

Разведение	Наличие роста бацилл (культальная жидкость бацилл)	Наличие роста бацилл (осадок, полученный с использованием 0,25% хитозана)	Наличие роста бацилл (осадок, полученный с использованием 0,5 % хитозана)	Наличие роста бацилл (надосадок полученный с использованием 0,25% хитозана)	Наличие роста бацилл (надосадок полученный с использованием 0,5% хитозана)
10 ¹	+	+	+	+	+
10 ²	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	-	\pm
10 ⁶	+	+	+	-	-
10 ⁷	+	+	+	-	-
10 ⁸	+	+	+	-	-
10 ⁹	+	+	+	-	-
10 ¹⁰	\pm -	+	+	-	-
10 ¹¹	-	+	\pm	-	-
10 ¹²	-	\pm	-	-	-

Приведенные в таблице данные свидетельствуют, что при использовании высокомолекулярного хитозана ММ 500 при концентрации 0,25 % отмечается концентрация бацилл из культуральной жидкости в 1000 раз (с 10⁹ до 10¹² КОЕ/м), при использовании 0,5 % раствора хитозана – концентрирование бактерий отмечается в 100 раз (с 10⁹ до 10¹¹ КОЕ/мл).

Таким образом установлено, что с помощью высокомолекулярного хитозана возможно провести концентрирование бацилл в 100–1000 раз, что имеет перспективу для получения и использования бациллярных препаратов как в ветеринарии (в качестве ветеринарных препаратов), так и в животноводстве (в качестве кормовых добавок).

Список литературы

1. Биополимеры, иммуномодуляторы и пробиотики в бройлерном птицеводстве / А.П. Дуктов [и др.]. Горки: БГСХА, 2016. 289 с.
2. Исследование адьювантных свойств сукцината хитозана / Д.П. Кузнецов [и др.] – ВНИРО/VNIRO Publishing, 2006.
3. Исследование сорбционной емкости кислоторастворимых хитозанов по отношению к бычьему сывороточному альбумину / В.А. Королева [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация 4 (2015): 85–89.

4. Использование иммуномодуляторов в бройлерном птицеводстве / А. П. Дуктов [и др.] – Тюмень: ГАУ Северного Зауралья, 2021. 352 с. Леваньков С.В. Адсорбционные свойства хитозана по отношению к белковым веществам / С.В. Леваньков, Е.В. Якуш //Известия ТИПРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). 2001. Т. 129. С. 121-128.
5. Области применения хитозана / Г.Г. Няникова [и др.] // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). 2007. №. 2. С. 20–26.
6. Перспективы использования хитозана как стабилизатора при коллоидных помутнениях / Трусова М. М., Камедько Т. Н., Павлова О. В. // Пищевая промышленность: наука и технологии. Т. 14, №. 4. С. 97–102.
7. Практические аспекты применения хитозана и его производных в различных областях народного хозяйства / М.А. Фролова [и др.], Изд-во ВНИРО/VNIRO Publishing.
8. Прикладные аспекты иммуномодуляции с использованием средств природного происхождения / П. А. Красочко [и др.] Краснодар: КубГАУ, 2021. 398 с.
9. Сорбционная способность различных модификаций хитозана в отношении регламентируемых микотоксинов / П.А. Красочко [и др.] // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3–1. С. 124–127.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

**А.И. Албулов¹, М.А. Фролова¹, П.А. Красочко²,
П.П. Красочко², А.В. Гринь¹, А.К. Елисеев¹**

¹ *Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности, Щелково, Московская область*

² *Учреждение образования «Витебская государственная академия ветеринарной
медицины», Витебск, Республика Беларусь
E-mail: info@bioprogress.ru*

Аннотация. Исследована возможность использования хитозана в качестве адьюванта в составе вакцинных препаратов. Установлено, что сукцинат и низкомолекулярная форма хитозана позволяют получать иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше известных масляных и сорбционных адьювантов. Наибольшей адьювантной активностью по отношению к ротавирусу обладали хитозан низкомолекулярный и его солевая форма глутамат, титры антител к E-sol1 после использования в составе колибактериозной вакцины различных хитозановых адьювантов были самыми высокими с сукцинатом хитозана и низкомолекулярным хитозаном (мм 80 кДа, СДА 87 %).

Ключевые слова: адьювант, вакцина, сукцинат хитозана, глутамат хитозана, альбумин, ротавирусы, колибактерии.