

6. Goryo, M., T. Suwa, T. Umemura, C. Itakura, and S. Yamashiro. Ultrastructure of bone marrow in chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB 1-TK5803 strain) // Avian Pathology. – 1989. – Vol. 18. – 329-343 p.

УДК 619:616.594

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА СУБЛИМАЦИИ ГРИБА ТРИХОФИТОН

**В.В. Зайцева**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

*(Поступила в редакцию 07.07.2014 г.)*

**Аннотация.** В работе дана оценка 5 схем сублимации дерматофитов. Гибель микроконидий дерматофитов при сублимации уменьшалась за счет использования криопротекторов определенного состава, регулирования скорости охлаждения и нагревания.

Для разработки оптимального метода сублимации дерматофита необходимо было повысить температуру «эвтектики» смеси грибной суспензии и защитной среды, установить момент завершения выхода всей свободной воды из препарата перед переводом его на этап досушивания.

Нами предложен оптимизированный процесс сублимации гриба трихофитон, позволяющий сохранить высокую жизнеспособность спор как после его окончания, так и при хранении в течение 12 месяцев.

**Summary.** The paper assesses five schemes for sublimation of dermatophytes. Dermatophyte microconidia death rate during sublimation decreased due to the use of cryoprotectants of certain composition, regulating of the cooling and heating.

Development of an optimum method of sublimation of dermatophytes required some raise of the "eutectic" mushroom mixture temperature and protective environment one, determination of the time of all free water output from a preparation before its proceeding to the final drying step.

We have proposed the optimized process of trihofiton fungus sublimation, allowing to maintain high viability both after its termination, and at storage within 12 months.

**Введение.** В настоящее время для сохранения ценных штаммов микроорганизмов, создания современных и рентабельных технологий получения биологических препаратов особенно актуальна оптимизация условий длительной консервации микроорганизмов. Для хранения промышленно ценных штаммов микроорганизмов должны использоваться методы, уменьшающие риск потери жизнеспособности и биологических свойств культур.

Классическими методами сохранения культур микроорганизмов

являются следующие: методы периодических пересевов на свежие питательные среды [6, 7]; метод хранения микроорганизмов в дистиллированной воде; метод поддержания микроорганизмов на скошенном агар-агаре без пересевов с заменой ватных пробок резиновыми; консервация в высушенном виде на полосках фильтровальной бумаги, на обезвоженном силикагеле, в пленках метилцеллюлозы; лиофилизация [8].

Наиболее распространенным из вышеперечисленных методов является лиофилизация [1].

При лиофилизации значительно уменьшается отрицательное действие обезвоживания, и высушенный материал может храниться длительное время [2, 3].

Известны способы консервации микроорганизмов путем их сублимации [4, 5].

Для научно обоснованного построения режима сушки большое значение имеет знание эвтектических температур биоматериалов, а также время выдерживания материала в эвтектической зоне до удаления большей части свободной влаги, составляющей в биоматериалах до 95% всей влаги. После удаления свободной влаги при температуре сублимации, равной верхней эвтектической температуре (наиболее рациональной с позиции экономичности процесса сушки, а также соблюдения наилучших условий сохранения исходных биологических свойств биопрепаратов), практически отсутствует опасность вспенивания биоматериала при форсированном переходе от фазы сублимации к фазе досушивания, т. е. при применении максимально допустимых температур на плитках и давлений в камере сублиматора для более быстрого перехода на стадию досушивания и максимального сокращения времени сушки в целом.

В настоящее время не существует простых инженерных методик оценки времени сублимационной сушки биоматериалов на требуемом температурном уровне и давлений в камере сублиматора, которые могли бы позволить специалистам цехов сушки и разработчикам новых видов биопрепаратов, хотя бы в первом приближении, оценить необходимое время сублимации до удаления большей части свободной влаги из биоматериалов при различных фасовках и защитных средах.

**Цель работы** – оптимизировать технологическую схему сублимации гриба трихофитон.

**Материал и методика исследований.** При разработке режимов сублимационного высушивания культур дерматофитов для определения жидкой фазы использовали датчик удельного сопротивления.

Оценку количества жидкой фазы в замороженном материале проводили по величине их диэлектрической проницаемости с помощью

емкостного датчика.

Частоту автогенератора, связанную с диэлектрической проницаемостью материала  $\epsilon$ , находящегося в емкостном датчике, устанавливали по формуле (1):

$$f = \frac{10^3}{2\pi\sqrt{L(\epsilon * C_p + C_n)}} \quad (1),$$

где:  $f$  – частота автогенератора, мГц;

$L=9,6$  – известная индуктивность контура автогенератора, мкГн;

$C_p$  и  $C_n$  – рабочая и паразитная емкость датчика.

Для определения  $C_p$  и  $C_n$  мы воспользовались тем, что известная частота пустого ( $\epsilon=1$ ) датчика  $f_0=11,75$  мГц и предельная частота, когда в материале отсутствует жидкая фаза (для льда  $\epsilon=3,3$ )  $f_{пр}=7,9$  мГц.

Количество жидкой фазы в замороженном биопрепарате находили по формуле Клаузиуса-Мосотти-Лоренца (2):

$$\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} = p \quad \frac{\epsilon_1 - 1}{\epsilon_1 + 2} + (1 - p) \frac{\epsilon_2 - 1}{\epsilon_2 + 2} \quad (2),$$

где:  $\epsilon$ ,  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_2$  – диэлектрические проницаемости замороженного биопрепарата в емкостном датчике жидкой фазы и льда соответственно, а  $p$  – объемное содержание жидкой фазы.

Общую продолжительность сушки биопрепаратов проводили согласно уравнению (3):

$$\tau = \frac{1}{N} \left[ (\omega_1 - \omega_k) + 2A \left( \frac{1}{\sqrt{\omega_2 - \omega_p}} - \frac{1}{\sqrt{\omega_k - \omega_p}} \right) + \beta(\omega_k - \omega_2) \right] \quad (3),$$

Определены эмпирические зависимости для расчета скорости сушки  $N$ , коэффициентов  $A$  и  $\beta$ , кристаллического влагосодержания  $\omega_k$  для защитных сред на основе обезжиренного молока, сахарозы + желатина, пептона + лактозы и при фасовке 6 мл в 20-мл пенициллиновые флаконы.

Для инженерных оценочных расчетов продолжительности удаления свободной влаги по уравнению (3) определяли значения  $\omega_1$ ,  $\omega_2$ ,  $\omega_p$ , где:  $\omega_1$ ,  $\omega_2$ ,  $\omega_p$  – начальное, текущее, равновесное влагосодержание, соответственно.

Для расчета продолжительности удаления свободной влаги из материала использовали уравнение (4):

$$\tau_p = \frac{1}{60N} \left[ (1500 - \omega_k) + 2A \left( 0,39 - \frac{1}{\sqrt{\omega_k^{-3,5}}} \right) + \beta(\omega_k - 10) \right] \quad (4),$$

где:  $\tau_p$  – время сублимации свободной влаги, ч;

$N$  – скорость сушки, %/мин;

$\omega_p$  – критическое влагосодержание, %;

$A$  и  $\beta$  – постоянные коэффициенты.

$N$ ,  $\omega_k$ ,  $A$ ,  $\beta$  – функции температуры сублимации и давления в камере сублиматора. Основной диапазон рабочих давлений в камере сублиматора на фазе сублимации лежит в пределах от 4 до 10,7 Па. Фасовка вакцины также различна и принята нами в пределах от 1 до 5 мл в пенициллиновых флаконах емкостью 10 см<sup>3</sup>. Для того, чтобы пользоваться уравнением (3) и для фасовок, отличных от 5 мл, нами принято допущение, что время сублимации свободной влаги прямо пропорционально фасовке, т.е.:

$$\frac{\tau_p}{\tau_i} = \frac{F_p}{F_i}$$

где  $\tau_p$  – время удаления свободной влаги, рассчитанное по уравнению (4);

$\tau_i$  – время удаления свободной влаги в зависимости от конкретной фасовки биоматериала;

$F_p$  = 5 мл – фасовка материала в 10-мл пенициллиновые флаконы;

$F_i$  – конкретная фасовка высушиваемого материала (в 10-мл пенициллиновые флаконы), мл.

Проведя преобразования, получили уравнение для расчета времени удаления влаги до уровня 10% влагосодержания (5):

$$\tau_i = 0,167 F_i \tau_p \quad (5)$$

Исследования по оценке процесса сублимации, его влияния на биологические свойства грибов трихофитон проводили в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», а также на участках изготовления вакцины против трихофитии и сублимации ОАО «БелВитунифарм».

Лиофилизацию грибов производили на аппаратах «Эдвардс» и «DGM NLG – 3,0».

Предварительно грибные культуры смешивали с защитной средой в соотношении 4:1 и фасовали по 5 см<sup>3</sup> в стерильные пенициллиновые флаконы и укупуривали пробкой типа «УЛ».

Перед смешиванием компоненты проверяли на стерильность путем посева на питательные среды: МПБ, МПА, среда Сабуро и Китт-Тароцци.

Сублимацию культур грибов осуществляли по 5 схемам.

#### Схема № 1

Замороженную грибную суспензию в течение 5 часов сублимировали без подогрева при температуре  $-50^{\circ}\text{C}$ . С 5 по 10 час от начала процесса продукт подогревали от  $-50$  до  $0^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0,17^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$ . С 10 по 17 час продукт инкубировали при  $0^{\circ}\text{C}$ . С 17 по 22 час продукт подогревали от  $0^{\circ}\text{C}$  до плюс  $25^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0,083^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . С 23 по 35 час продукт инкубировали при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### Схема № 2

Замороженную грибную суспензию в течение 4 часов инкубировали при температуре  $-42-44^{\circ}\text{C}$ . С 4 по 24 час продукт инкубировали при режиме подогрева  $2^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . С 24 по 30 час от начала процесса продукт подогревали в режиме  $5^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . С 30 по 48 час процесс досушивания продукта проводили при температуре  $26-28^{\circ}\text{C}$ .

#### Схема № 3

Замороженную грибную суспензию в течение 42 часов сублимировали без подогрева при  $-35^{\circ}\text{C}$ . С 42 по 60 час процесс сублимации вели в режиме подогрева  $2^{\circ}\text{C}/\text{час}$  до установления в продукте температуры  $0 - +2^{\circ}\text{C}$ . С 60 по 72 час продукт подогревали в режиме  $2^{\circ}\text{C}/\text{час}$  до установления температуры в нем до плюс  $23-25^{\circ}\text{C}$ . С 72 по 85 час процесс досушивания вели при температуре продукта  $25-28^{\circ}\text{C}$ .

#### Схема № 4

Замороженную грибную суспензию первые 13 часов сублимировали без подогрева продукта при  $-40^{\circ}\text{C}$ . С 13 по 24 час от начала процесса продукт подогревали до  $-35^{\circ}\text{C}$ , с 24 по 30 час – до  $-25^{\circ}\text{C}$ , с 30 по 35 час – до  $-15^{\circ}\text{C}$ . С 36 по 40 час продукт подогревали от  $-15$  до  $-5^{\circ}\text{C}$ , с 40 по 45 час – до  $0^{\circ}\text{C}$ , с 45 по 49 час – до плюс  $5^{\circ}\text{C}$ . С 49 по 55 час продукт подогревали плавно до плюс  $10^{\circ}\text{C}$ , далее с 55 по 59 час – до плюс  $15^{\circ}\text{C}$ , с 59 до 64 час – до плюс  $20^{\circ}\text{C}$ , с 64 по 68 час – до плюс  $25^{\circ}\text{C}$ . С 68 по 75 час вели процесс досушивания при плюс  $25-28^{\circ}\text{C}$ .

#### Схема № 5

Первые 7 часов процесс вели при  $-35-40^{\circ}\text{C}$  без подогрева. С 7 по 10 час продукт подогревали до  $-30^{\circ}\text{C}$ , с 11 по 14 час – до  $-25^{\circ}\text{C}$ , с 14 по 25 час – до  $-20^{\circ}\text{C}$ . С 25 по 31 час продукт подогревали до  $-15^{\circ}\text{C}$ , с 31 по 37 час – до  $-10^{\circ}\text{C}$ , с 37 по 47 час – до  $-5^{\circ}\text{C}$ , с 47 по 55 час – до  $0^{\circ}\text{C}$ . С 55 по 58 час продукт подогревали плавно до плюс  $5^{\circ}\text{C}$ , с 58 по 60 час – до плюс  $10^{\circ}\text{C}$ , с 60 по 65 час – до плюс  $25^{\circ}\text{C}$ .

Досушивание вели при температуре плюс  $25-28^{\circ}\text{C}$  в течение 5 часов. Полный цикл процесса сублимации составил 70 часов.

Учет количества живых микроконидий вели сразу после изготовления вакцины и через 12 месяцев хранения.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Нами проведены

расчеты времени удаления свободной влаги при различной температуре сублимации, фасовке, защитной среде, которые сопоставлены с опытными данными по сушке биопрепаратов при регистрации момента удаления большей части свободной влаги с помощью датчика «Удельное сопротивление» и результатами по кинетике сушки.

Результаты исследований показали, что величина  $\omega_1$ , в зависимости от содержания сухих веществ в исходном материале, в основном колеблется от 1200 до 1800%. Для последующих расчетов величина была принята равной 1500%.

Величина  $\omega_2$  – влагосодержание, соответствующее 10%. Среднее значение величины  $\omega_p$  в опытах составило 3,5% при температуре досушивания 20-30°С и давлении в камере сублиматора – 40-60 мкм рт. ст.

Расчеты (по формулам (3) и (4)) и опытные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Расчетные и опытные значения времени удаления влаги до 10% влагосодержания в биоматериале

| Защитная среда                  | Фасовка, мл | Температура сублимации, °С | Давление в камере, Па | Расчетное время, ч | Опытное время, ч |
|---------------------------------|-------------|----------------------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| Обезжиренное молоко (50%)       | 4           | -25                        | 8                     | 12,8               | 13               |
|                                 | 4           | -25                        | 8                     | 13,2               | 14               |
|                                 | 4           | -33                        | 7                     | 14,6               | 22               |
|                                 | 4           | -35                        | 8                     | 16,3               | 23               |
|                                 | 6           | -35                        | 8                     | 27,0               | 30               |
| Сахароза (10%) + желатин (1,5%) | 2           | -26                        | 10,7                  | 8,4                | 10,0             |
|                                 | 4           | -32                        | 6,7                   | 16,4               | 19,8             |
|                                 | 4           | -35                        | 6,7                   | 27,2               | 30,2             |

В таблице 2 представлены основные этапы и продолжительность сушки культур грибов по разным схемам.

Таблица 2 – Продолжительность основных этапов высушивания дерматофитов

| Схема высушивания | Продолжительность этапов |                  | Продолжительность сушки, час |
|-------------------|--------------------------|------------------|------------------------------|
|                   | сублимации, час          | досушивания, час |                              |
| 1                 | 35                       | 5                | 40                           |
| 2                 | 38                       | 10               | 48                           |
| 3                 | 60                       | 25               | 85                           |
| 4                 | 69                       | 6                | 75                           |
| 5                 | 65                       | 5                | 70                           |

По схеме № 1 и № 2 сублимацию вели по укороченному режиму соответственно в течение 40 и 48 часов. Продолжительность процесса сушки культуры гриба по схемам 3,4 и 5 составила соответственно 85, 75 и 70 часов.

Из результатов, приведенных в таблице 3, следует, что культура грибов, высушенная по укороченным схемам № 1 и № 2, после окон-

чания процесса сохраняет жизнеспособность микроконидий соответственно на 36,1-47,8%.

Таблица 3 – Влияние схемы сублимации на жизнеспособность спор дерматофитов *Trichophyton verrucosum* № 130

| Схема сушки | Количество живых микроконидий |      |                     |      | Общее количество микроконидий |       |                     |      |
|-------------|-------------------------------|------|---------------------|------|-------------------------------|-------|---------------------|------|
|             | при закладке                  |      | после сушки         |      | при закладке                  |       | после сушки         |      |
|             | млн/см <sup>3</sup>           | %    | млн/см <sup>3</sup> | %    | млн/см <sup>3</sup>           | %     | млн/см <sup>3</sup> | %    |
| 1           | 234,7±2,0                     | 96,9 | 84,7±3,0            | 36,1 | 242,3±2,5                     | 100,0 | 169,7±2,0           | 70,0 |
| 2           | 233,7±2,0                     | 96,7 | 111,7±2,0           | 47,8 | 241,6±2,0                     | 100,0 | 200,0±4,5           | 82,8 |
| 3           | 233,7±2,0                     | 96,7 | 192,7±3,0           | 82,4 | 241,7±2,5                     | 100,0 | 222,0±2,5           | 91,8 |
| 4           | 235,3±3,0                     | 98,1 | 221,0±2,5           | 93,9 | 240,0±2,0                     | 100,0 | 238,3±2,0           | 99,3 |
| 5           | 228,0±2,0                     | 96,6 | 220,3±1,5           | 96,6 | 236,0±2,0                     | 100,0 | 234,3±1,5           | 99,3 |

Таким образом, сушка культур грибов по укороченным схемам приводит к существенному падению жизнеспособности спор, что неприемлемо при изготовлении вакцин. Напротив, сушка культур грибов по схемам №3, 4 и 5, позволяет сохранить их жизнеспособность соответственно на 82,4%, 93,9% и 96,6%.

Для окончательного выбора схемы сушки мы заложили препараты для хранения при температуре -10°С на 12 месяцев.

Результаты влияния схем № 4 и 5 на выживаемость спор в процессе хранения помещены в таблицы № 4, 5 и 6.

Таблица 4 – Влияние схемы № 4 и 5 сублимационного высушивания на сохранность и жизнеспособность микроконидий *Trichophyton verrucosum* № 130 в процессе хранения

| Схема сушки | Количество живых микроконидий |       |                     |      | Общее количество микроконидий |       |                     |      |
|-------------|-------------------------------|-------|---------------------|------|-------------------------------|-------|---------------------|------|
|             | при изготовлении              |       | через 12 месяцев    |      | при изготовлении              |       | через 12 месяцев    |      |
|             | млн/см <sup>3</sup>           | %     | млн/см <sup>3</sup> | %    | млн/см <sup>3</sup>           | %     | млн/см <sup>3</sup> | %    |
| 4           | 235,7±1,5                     | 100,0 | 220,7±2,0           | 93,6 | 244,7±3,0                     | 100,0 | 237,7±2,5           | 97,1 |
| 5           | 227±4,0                       | 100,0 | 206,3±1,5           | 90,9 | 239,3±3,0                     | 100,0 | 223,3±2,5           | 93,3 |

Таблица 5 – Влияние схемы № 4 и 5 сублимационного высушивания на сохранность и жизнеспособность спор *Trichophyton verrucosum* № 11183 в процессе хранения

| Схема сушки | Количество живых микроконидий |       |                     |      | Общее количество микроконидий |       |                     |      |
|-------------|-------------------------------|-------|---------------------|------|-------------------------------|-------|---------------------|------|
|             | при изготовлении              |       | через 12 месяцев    |      | при изготовлении              |       | через 12 месяцев    |      |
|             | млн/см <sup>3</sup>           | %     | млн/см <sup>3</sup> | %    | млн/см <sup>3</sup>           | %     | млн/см <sup>3</sup> | %    |
| 4           | 235,3±2,0                     | 100,0 | 221,0±4,0           | 93,9 | 245,0±2,5                     | 100,0 | 236,3±1,5           | 96,5 |
| 5           | 227,3±2,0                     | 100,0 | 205,7±1,5           | 90,5 | 241,0±3,5                     | 100,0 | 227,0±2,5           | 94,2 |

Таблица 6 – Влияние схемы № 4 и 5 сублимационного высушивания на сохранность и жизнеспособность спор *Trichophyton mentagrophytes* в процессе хранения

| Схема сушки | Количество живых микроконидий |   |                     |   | Общее количество микроконидий |   |                     |   |
|-------------|-------------------------------|---|---------------------|---|-------------------------------|---|---------------------|---|
|             | при изготовлении              |   | через 12 месяцев    |   | при изготовлении              |   | через 12 месяцев    |   |
|             | млн/см <sup>3</sup>           | % | млн/см <sup>3</sup> | % | млн/см <sup>3</sup>           | % | млн/см <sup>3</sup> | % |

|   |           |       |           |      |           |       |           |      |
|---|-----------|-------|-----------|------|-----------|-------|-----------|------|
| 4 | 233,0±2,0 | 100,0 | 216,7±1,5 | 93,0 | 244,3±2,5 | 100,0 | 235,0±1,5 | 96,2 |
| 5 | 227,3±2,5 | 100,0 | 199,7±2,0 | 87,8 | 239,0±2,0 | 100,0 | 225,3±1,5 | 94,3 |

Из полученных данных видно, что наиболее высокая жизнеспособность микроконидий обеспечена у культур, высушенных по схеме № 5, и составляет 93-95%.

Таким образом, нами экспериментально отработан режим сублимационного высушивания дерматофитов, который позволил получить полностью кондиционный препарат, обладающий однородной структурой.

**Заключение.** Разработан способ сублимации культур дерматофитов, позволяющий сохранить высокую жизнеспособность спор как непосредственно после окончания процесса, так и через 12 месяцев хранения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Астапович, Н.И. Изучение режима лиофилизации мицелия базидиальных грибов, полученного в условиях глубинного культивирования / Н.И. Астапович, А.В. Кантерова, Н.В. Образцова // Микробиология и биотехнология XXI столетия: материалы Междунар. конф., 22-24 мая 2002 г. – Минск, 2002. – 8-9 с.
2. Булыгина, Е.М. Изучение условий лиофилизации бактериофагов / Е.М. Булыгина, В.Л. Беликова, Н.В. Образцова // Микробиология и биотехнология XXI столетия: материалы Междунар. конф., 22-24 мая 2002 г. – Минск, 2002. – 15-16 с.
3. Кантерова, А.В. Влияние условий лиофилизации на выживаемость дрожжей *Kluuyveromyces lactis* и *Bulleromyces albus* / А.В. Кантерова, Н.В. Образцова // Проблемы микробиологии и биотехнологии: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 25-27 ноября 1998 г. – Минск, 1998. – 49-51 с.
4. Кобатов, А.И. Отработка регламента получения сухой вирус-вакцины против вирусного гепатита утят из штамма к УНИИП / А.И. Кобатов, Б.А. Никонов, С.Ф. Антонов // «Архив ветеринарных наук». – С.-Петербург, Ломоносов, 1998. – Т. 1 (48). – 109-120 с.
5. Ситьков, В.И. Научные и практические основы промышленного производства и применения вакцин: дис. д-ра вет. наук: 12.00.03/ В.И. Ситьков. – М., 1997. – 58 с.
6. Lapage, S.P. Preservation of microorganisms / S.P. Lapage, K.F. Redway // Handbook. Microbiology. Vol. 1. Cleveland, Ohio, - 1983. – 713-724 p.
7. Raper, K.B. Genera methods for preserving cultures / K.B. Raper // In Culture Collection 1993. № 81. Ed. Univ. of Toronto Press, Toronto. – 356 p.
8. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage / Miyamoto-Shinohara Y. [et al.] // Cryobiology. – 2000. – Nov. 41 (3). – 251-255 p.