

# ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ЛИОФИЛИЗАЦИИ СУСПЕНЗИИ БАКТЕРИОФАГОВ

**Балтаева Гульшат Закирджановна, студентка**

**тел.: 8(8422) 55-95-47, jandaneziz@gmail.com**

**Гранкина Анастасия Сергеевна, соискатель**

**тел.: 8(8422) 55-95-47, nastenysh-sovenok@mail.ru**

**Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических  
наук, доцент**

**тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru**

**ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

**Ключевые слова:** *лиофилизация, стабилизатор, бактериофаг, ампула, показатель*

В статье представлены результаты исследований по разработке параметров лиофилизации суспензии бактериофагов. Соотношение компонентов, стабилизатора и суспензии бактериофага, составляло 1:1. Необходимо проведение предварительной заморозки при температуре -45-50°C в течение 18 часов. Процесс лиофилизации длился 24 часа, затем проводится досушивание препаратов с помощью инфракрасной лампы, доводя температуру препарата до +28°C. Запаивание ампул проводится под вакуумом. В результате соблюдения всех параметров подготовки и самого процесса лиофилизации, запаивания ампул нами были получены готовые препараты бактериофагов.

**Введение.** Конечная цель лиофилизации - получение препарата с низкой остаточной влажностью (менее 1 % к весу сухого остатка). Процесс высушивания складывается из удаления свободной воды из препарата и досушивания - удаления связанной воды. Связанная вода удаляется плохо,

поэтому досушивание проводят при повышенной температуре (20°C и выше) и улучшении вакуума в системе [1]. В отдельных случаях на этой стадии применяют специальные химические поглотители (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) и высоковакуумные диффузионные насосы в дополнение к насосам и поглотителям, используемым на стадии удаления свободной воды. Высушенные препараты хранят в герметизированной посуде - флаконах, банках, ампулах - для предотвращения их увлажнения при контакте с влажным воздухом.

Преимущества такого способа высушивания - отсутствие воздействия высоких температур на препарат, сохранение дисперсной фазы препарата, возможность использования летучих растворителей. Метод лиофилизации позволяет получать препараты без потери их структурной целостности и биологической активности [2]. При лиофилизации большинство белков не подвергается денатурации и может длительно сохраняться при умеренном охлаждении (около 0 °С). Лиофилизированные препараты при увлажнении восстанавливают свои первоначальные свойства.

**Объекты и методы исследований.** Штаммы фагов: *FBc* №96 и *FBmuc H*. Питательные среды: мясопептонный бульон, мясопептонный агар. Оборудование: холодильники бытовые, холодильник низкотемпературный VESTFROSTVT 147, термостат ТС-80М-2, микроскоп «Биомед -6», лупа ЛПИ-464М-7х, мембранные фильтры «Миллипор» диаметром 0,1, 0,2, 0,45 мкм, центрифуги лабораторные ОПн-8УХЛ4,2 и ЦЛС-3, весы чашечные с разновесами, электронные весы, автоклав, сушильный шкаф, водяная баня, сублимационная сушка серии Scientz-N, отсасыватель медицинский «ОМ-1», шприцы медицинские объемом 5 мл, 10 мл, 20 мл, иглы Сельдингера, иглы И-270 - 2,0×180, ампулы 5 мл, стекла покровные, стекла предметные, термометр ртутный, бактериологическая лабораторная посуда (чашки Петри, пробирки, колбы, пипетки, шпатели).

**Результаты собственных исследований и их обсуждение.** По отзывам и рекомендациям из литературы [3-5], нами были подобраны

компоненты и составлены среды для высушивания. Среда 1 и 2 были разработаны нами, исходя из множества просмотренных вариаций. Стабилизаторы 3 и 4 уже проверены на опытах высушивания вирусов, но именно для лиофилизации бактериофагов рода *Bacillus* нами данные не были найдены. Исходя из этого, мы решили взять готовые среды для высушивания и проверить их действие.

Стабилизаторы:

1. Сухое обезжиренное молоко (9%), лактоза (5%), сахароза (5%).
2. Дрожжевой экстракт (3%), сахароза (2%).
3. Лактоза (1%), сорбит (1%), сахароза (3%), желатин (2%), дрожжевой экстракт (1%).
4. Сухое обезжиренное молоко (14%), инозита (5%).

Рассмотрим некоторые компоненты, используемые для приготовления стабилизаторов.

Сухое обезжиренное молоко содержит в своем составе большой процент белков и молочного сахара.

Основными компонентами дрожжевого экстракта являются продукты распада белков (пептиды, свободные аминокислоты) и нуклеотиды, а также он богат витаминами группы В (В1, В2, В6, В3, В7, В9, В5).

Желатин – его основа-это белок и аминокислоты.

Все компоненты безвредны для хранения бактериофагов и способствуют их сохранности, они проверены на опытах, только в других вариациях.

Компоненты для каждой среды смешивали в 100 мл дистиллированной воды, и растворяли на кипящей водяной бане (чтобы избежать подгорания компонентов). Стерилизацию проводили автоклавированием при 0,5 атм в течение 25-30 минут. Готовые среды хранили в холодильнике при температуре не выше 10°C (рис.1).



Рисунок 1 - Защитные среды (стабилизаторы)

Следующим этапом нашей работы было смешивание готовых стабилизаторов и суспензий бактериофагов.

Ампулы, шприцы, иглы, хлопковая ткань, пробирки перед работой были проавтоклавированы. Дно одной из сторон ампулы разбивали с помощью стеклянного пробойника и укладывали в штативы. Стабилизаторы и суспензии смешивали 1:1 (5мл каждого) в стерильных пробирках. Перед разливом в ампулы пробирку слегка встряхивали для смешивания получившейся массы. Разливали по 1 мл в ампулы с помощью шприцов с металлическими иглами. После из ампул образовывали пучки и сверху накрывали их хлопковой тканью для сохранения стерильности.

Далее ампулы ставили на предварительную заморозку в холодильную камеру при температуре  $-45^{\circ}\text{C}$  на 18 часов.

Перед процессом лиофилизации проводили уборку помещения. Столы и оборудование протирали смесью из 70% спирта и 1% хлорамина. Включали бактерицидные лампы на 15 минут.

Достав ампулы из холодильника, переносим их в камеру лиофильной сушки, предварительно положив мини холодильники под нижнюю полку камеры для поддержания еще большей минусовой температуры. Между

ампулами также устанавливали датчик температуры для контроля. Накрывали колпаком и включали вакуум (рис. 2).

Для осуществления режима первичного высушивания в камере сублиматора создается вакуум для того, чтобы обеспечить свободную диффузию водяных паров от замороженной массы к охлажденной поверхности конденсатора. В общей сложности процесс лиофилизации длился 24 часа. Первые 12-14 часов температура возрастала от  $-30^{\circ}\text{C}$  до  $0^{\circ}\text{C}$ .

На протяжении большей части цикла сублимации высушиваемый продукт находится при значительно более низкой температуре, чем полки сублиматора. Лишь к концу этого цикла температура продукта сравнивается с температурой полок. Конечное содержание воды после первичного высушивания обычно составляет от 7 до 10%. Следовательно, для достижения влаги в диапазоне от 1 до 3%, необходим цикл вторичного высушивания.



Рисунок 2 - Установка лиофильной сушки в процессе работы

Эта дополнительная стадия высушивания называется десорбцией. При осуществлении данной стадии необходимо избежать эффекта пересушки, т.е. снижения допустимого содержания влаги ниже 1%.

В промежутке времени 15-24 ч. Температура повышалась от  $0^{\circ}\text{C}$  до  $+18^{\circ}\text{C}$ .

Досушивание препаратов проводили с помощью инфракрасной лампы для удаления остаточной влаги, доводя температуру датчика до 28°C.

Отключали конденсор, спускали вакуум, после снимали колпак, убирали датчик и доставали полки с ампулами.

Высушенные препараты запаивали под вакуумом. На разбитый конец ампулы надевали резиновый вакуум-шланг, который присоединяли к вакуум-насосу. С помощью газовой горелки, когда внутри ампулы достигнуто необходимое разрежение, не отключая вакуум-насоса, обогревали вкруговую наиболее узкое место ампулы. Стекло размягчалось и под влиянием наружного атмосферного давления сплавлялось, закрывая просвет в трубке. После этого узким пламенем размягчали стекло на наружной части ампулы и растягивали выше места сая участок сплошного стекла. Наружную часть растянутой трубки оттягивали и закругляли на пламени (рис.3).



Рисунок 3 - Процесс запаивания ампул под вакуумом

Хранили запаянные ампулы в условиях бытового холодильника при температуре 4-6°C.

**Выводы.** Нами были подобраны оптимальные составы защитных сред для лиофилизации бактериофагов. Все компоненты, используемые нами для приготовления стабилизаторов, безвредны, и способствовали долгому

хранению бактериофагов. Для предотвращения проникновения воздуха в ампулы через микротрещины рекомендуем запаивать концы ампул обрабатывать в расплавленном парафине.

Разработаны следующие параметры лиофилизации суспензии бактериофагов. Соотношение компонентов, стабилизатора и суспензии бактериофага, составляло 1:1. Предварительную заморозку проводили при -45-50°C в течение 18 часов. Процесс лиофилизации длился 24 часа, затем проводили досушивание препаратов с помощью инфракрасной лампы, доводя температуру препарата до +28°C. Запаивание ампул проводили под вакуумом. В результате соблюдения всех параметров подготовки и самого процесса лиофилизации, запаивания ампул нами были получены готовые препараты бактериофагов.

#### **Список литературных источников**

1. Никитин, Е.Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов / Под ред. Е.Е. Никитина, И.В.Звягина. – М.: Колос, 1971. – 306 с.
2. Коростелева, Н.И. Биотехнология. Учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. – Барнаул Издательство АГАУ 2006.-127 с.
3. Македонова, Л.Д. Подбор защитных сред для лиофильного высушивания холерных фагов / Л.Д. Македонова, В.И. Арутюнов, Т.Л. Кудрякова, Н.А. Наталич, В.В. Кадетов //Вирус микроорганизмов и растений: Тез.Всесоюз.конф. - Ташкент, 1986. - С.203-204.
- 4.Фурик, Н. Н. Влияние состава защитных сред на выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий при лиофилизации / Н. Н. Фурик, Е. М. Кононович, А. Н. Картель // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2009. – №3(5). – С. 36-39.
5. Шульга С. М. Влияние лиофилизации на жизнеспособность дрожжей *Pichiaanomala* / С. М. Шульга, Е. А. Тигунова, А. Ф. Ткаченко // *BiotechnologiaActa*. - 2011. - Т. 4, №4. - с. 80-86.

**SELECTION OF OPTIMAL COMPOSITION OF PROTECTIVE  
MEDIUM FOR LYOPHILIZATION AND DEVELOPMENT OF  
PARAMETERS FOR LYOPHILIZATION OF BACTERIOPHAGE  
SUSPENSION**

**Baltayeva G.Z., Grankina A.S., Feoktistova N.A.**

*Keywords: lyophilization, stabiliser, bacteriophage, ampoule, index*

*The article presents the results of studies on the development of lyophilization parameters of bacteriophage suspension. The ratio of the components of the stabilizer to the bacteriophage suspension was 1:1. It is necessary to perform preliminary freezing at -45-50 ° C for 18 hours. The lyophilization process lasted 24 hours, followed by drying the preparations with an infrared lamp, bringing the temperature of the preparation to 28 ° C. The ampoules are sealed under vacuum. As a result of compliance with all parameters of preparation and the process of lyophilization, sealing of ampoules, we obtained ready-made preparations of bacteriophages.*