Лобжанидзе Натела Николаевна
студент
Русина Дарья Семеновна
студент
Сокульская Наталья Николаевна
канд. хим. наук, доцент
Денисова Евгения Владимировна
канд. биол. наук, доцент
Ивченко Глеб Сергеевич
канд. мед. наук, доцент
ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
г. Ставрополь, Ставропольский край

ОПТИМИЗАЦИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Аннотация*: в результате исследования была изучена возможность конструирования бессывороточных питательных сред или сред с пониженным содержанием сыворотки, содержащих ферментативный гидролизат мышц, пептон, твин-80, бычий сывороточный альбумин и факторы роста.*

Ключевые слова*: ферментативные гидролизаты мышц, углеродсодержащие соединения, факторы роста, питательные среды, метаболизм, культивирование.*

Зоонозные заболевания человека и животных регистрируются во многих странах мира и имеют большое социально-экономическое значение. В Российской Федерации на большой территории страны всегда существует значительное число природных очагов и формирование стойких антропургических очагов, что создает постоянную угрозу возникновения заболеваний людей и сельскохозяйственных животных. Активизации природно-очаговых инфекций способствует сокращение вакцинопрафилактических работ в связи с резким удорожанием препаратов. В связи с этим на первый план выходит разработка средств для специфической иммунопрофилактики.

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

Очевидна актуальность совершенствования методов борьбы с опасными зооантропонозами не только подбором необходимых антигенов в вакцины на основе изучения этиологии и эпизоотологии, но и путем совершенствования технологии изготовления биопрепаратов. Одним из основных условий получения высокого результата в микробиологической промышленности является правильно подобранная питательная среда для культивирования микроорганизмов.

Питательная среда должна содержать источники органогенов, необходимые неорганические соединения, витамины, иногда другие комплексы, обладать определенным изотоническим для клеток микроорганизмов осмотическим давлением, иметь определенные концентрации водородных ионов, быть стерильной; желательно чтобы среда была прозрачной, позволяющей наблюдать за ростом микроорганизмов. Питательные среды для культивирования микроорганизмов с целью изготовления вакцинных препаратов, помимо того, не должны снижать иммуногенных качеств штаммов-продуцентов.

Очень часто для культивирования используется достаточно дорогие сывороточные среды, ростовые свойства их во многом зависят от физиологического состояния доноров-продуцентов, они не подлежат стерилизации автоклавированием. Кроме того, в случае обнаружения в сыворотке продуцентов гомологичных антител, возможно изменение культуральных, антигенных и вирулентных свойств.

Эти факторы явились предпосылкой к многочисленным попыткам создания и внедрения в производственную практику бессывороточных сред или сред с минимальным содержанием сыворотки за счет использования других видов сырья стандартного состава и стимуляторов роста.

Целью исследования является исследование возможностей оптимизации химического состава питательной среды для производства различных вакцин.

Для достижения указанной цели предполагалось решить следующие задачи:

– изучить возможности использования в качестве источника азота ферментативных гидролизатов мышц;

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

– исследовать возможность введения в состав среды доступных источников углерода, а также факторов роста;

– сконструировать питательную среду для культивирования, позволяющую сократить потребление сывороточного сырья.

Поджелудочная железа вырабатывает комплекс сериновых протеаз, расщепляющих пептиды и сложные эфиры; липазу, расщепляющую жиры; диастазу, гидролизующую крахмал и гликоген; мальтазу, расщепляющую мальтозу и другие ферменты.

Основным действующим началом поджелудочной железы является трипсин, который наряду с другими панкреатическим ферментами – химотрипсином и эластазой (сериновыми протеазами) имеет уникальный по своей активности сериновый остаток, который необратимо реагирует с фосфороорганическими соединениями.

Для приготовления питательных сред поджелудочная железа может применяться в свежем виде, замороженном, консервированной глицерином или солью, или в виде сухих препаратов (панкреатин). Определение активности поджелудочной железы проводили по следующим способом.

1) 0,125 г казеина растворяют в 0,75 мл 10% раствора двууглекислого натрия, добавляют 10–15 мл воды; смесь подогревают до полного растворения и переносят в мерную колбу емкостью 250 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

2) Уксусно-алкогольный раствор: 50 мл 96° этилового спирта смешивают с 50 мл дистиллированной воды и 0,25 мл ледяной уксусной кислоты.

3) Вытяжка поджелудочной железы: навеску в 1–2 г переносят в мерную колбу на 500 мл, доводят до метки дистиллированной водой, нагревают до 37–40° и выдерживают при этой температуре 30 мин, охлаждают и фильтруют.

Ингредиенты смешивают в количествах, указанных в таблице 1. Пробирки со смесью выдерживают при 37°С 30 мин, после чего охлаждают под струей холодной воды и затем в каждую из пробирок добавляют 0,5 мл уксусно-алкогольного раствора.

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

Таблица 1

Соотношение компонентов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Дист. вода, мл	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-
Вытяжка подж. жел., мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Р-р. казеина, мл	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Для приготовления ферментативного гидролизата мышц (ФГМ) используют мясо крупного рогатого скота, освобожденное от жира, фасций, сухожилий, перемалывают его на мясорубке. Одновременно в реакторе подогревают воду, до +60–65° С добавляют мясной фарш в соотношении 1,5:1, то есть к 1,5 л воды добавляют 1 кг фарша при постоянно включенной мешалке. В реактор добавляют двууглекислый натр, снижали температуру до +45 °С и к полученной смеси добавляют фарш поджелудочной железы из расчета 300–400 г на 1 кг фарша. В качестве консерванта используют хлороформ в концентрации 1–2%. Гидролиз мяса проводят в течение 5–7 сут. при +42 °С. При необходимости в реактор дополнительно добавляют поджелудочную железу и двууглекислый натр для лучшего прохождения гидролиза. После окончания гидролиза гидролизат раскисляют соляной кислотой до pH (4,7–4,5).

Изготовлено 2 серии ФГМ, определены его основные химические показатели:

– pH,

– определение аминного азота формольным титрованием,

– определение суммарного содержания полипептидов (пептонов), как показателя глубины гидролиза белка.

– определение свободного триптофана по методу М.А. Пешкова.

Химические показатели полученных панкреатических гидролизатов измерялись в 5 повторностях, результаты анализов представлены в таблице 2.

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

Таблица 2

Химические показатели различных серий ФГМ

№ п/п	Наименование показателя	№ варианта среды	
		1	2
1	pH	6,10 6,11 6,09 6,12 6,11	6,43 6,42 6,38 6,40 6,40
2	Аминный азот (мг, %)	750,38 750,36 750,40 750,44 750,44	700,10 700,15 700,10 700,20 700,15
3	Пептон,%	2,51 2,50 2,55 2,53 2,51	2,82 2,78 2,85 2,80 2,80
4	Триптофан, мг%	120,56 120,50 120,54 120,54 120,55	135,85 135,88 135,90 135,00 135,88

Для приготовление белковой составляющей среды мы выбрали оптимальную концентрацию пептона, ферментативного гидролизата и овечьей сыворотки. Пептон растворяют в 1/15 М фосфатно-солевом буфере Зеренсена (ФСБ) и автоклавируют при 120° С 30 мин. На следующий день дважды фильтруют через бумажный фильтр, разливают в баллоны объемом 10 л и автоклавируют при 120° С 1 ч.

В баллоны добавляют инактивированную при 56–58°С в течение 30 мин овечью сыворотку, фильтруют среду через мембранные фильтры марки СФ диаметром пор 0,2 мкм и выдерживают при температуре 37° С в течение 3–5 сут. в термокамере. Смешивание 3-х азотсодержащих компонентов среды производят в различных концентрациях с целью учета последующего накопления биомассы при культивировании. Нами предпринята попытка полностью исключить сыворотку крови овец из состава питательной среды.

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

При подборе концентрации углеводсодержащих компонентов и витаминов в баллоне объемом 10 л с ФСБ смешивают Твин-80, белковый сывороточный альбумин для детоксикации жирных кислот и растворы факторов роста – витамины B_1 и B_{12}. Фильтруют методом холодной фильтрации через мембранные фильтры марки СФ диаметром пор 0,2 мкм, инкубируют при температуре 37° С в течение 3–5 сут. в термокамере. Смешивают компоненты среды в различных концентрациях для учета последующего накопления биомассы при культивировании.

Таким образом с целью оптимизации химического состава среды для культивирования нами предпринята попытка введения в него новых белковых и углеродсодержащих компонентов, а также факторов роста. Изучена возможность использования в среде в качестве источника азота ферментативного гидролизата мышц в сочетании с пептоном при одновременном сокращении процентного содержания сыворотки крови овец в среде. Приготовлено 2 серии панкреатического гидролизата, изучены их физико-химические характеристики. На ростовые свойства испытано 10 вариантов белковых сред, выбран лучший вариант.

В углеродсодержащую составляющую часть среды введен полисорбат Твин-80 с детоксикатором БСА и факторами роста – витаминами B_1 и B_{12}.

В результате соединения белковой и углеродсодержащей фракций сконструирована среда оптимального состава. Она позволила сократить содержание такого дорогостоящего и нестабильного компонента, как сыворотка крови овец с 7 до 3%. В среду введено 1,5% ФГМ, 0,1% пептона, 0,5% Твин-80, 0,00005% витамина B_1, 0,0000001% витамина B_{12}.

Изучение физико-химических показателей среды показало соответствие ее нормативным требованиям, предъявляемым к промышленным биопрепаратам.

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)