

УДК 615.012.6

РАЦИОНАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ИЗ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОГО СЫРЬЯ

© 2008 г. Л.Д. Тимченко¹, И.Н. Ткаченко², Л.С. Катунина³

Использованы рациональные подходы к разработке новых питательных сред из экологически чистого сырья. Разработана технология приготовления питательных сред из молок лососевых рыб по различной рецептуре. На основе ферментативного гидролизата сконструирована новая питательная среда, на которую были засеяны культуры 8 тест-штаммов. Культуральные и морфологические свойства всех микроорганизмов наиболее ярко проявились на питательной среде, содержащей ферментативный гидролизат с использованием поджелудочной железы КРС и пепсина.

Питательные среды являются основным звеном в системе микробиологических и биотехнологических исследований. Для культивирования микроорганизмов в лабораторных и промышленных условиях используют множество питательных сред. Они различаются: по консистенции – жидкие, полужидкие, плотные; по происхождению – из животного и растительного сырья, а также синтетические. По мнению И.К. Тутова, В.И. Ситькова [1], питательные среды подразделяются на простые, наиболее часто используемые для выращивания большого числа видов микроорганизмов, специальные и производственные. Специальные среды весьма многообразны и используются для выращивания особых групп микроорганизмов, которые не растут или растут плохо на обычных питательных средах. В соответствии с задачами и отдельными этапами исследований специальные питательные среды делятся на консервирующие, среды обогащения, селективные и дифференциально-диагностические [1].

Все перечисленные группы питательных сред независимо от классификационной принадлежности должны отвечать следующим основным требованиям: быть стерильными, достаточно влажными, иметь оптимальную pH, содержать необходимые питательные вещества (источники азота, углеродного питания, ростовые вещества,

минеральные элементы) [2–6]. Такие свойства обеспечиваются подбором оптимального качественного и количественного состава, а также технологии приготовления среды.

Белковая питательная основа является универсальным компонентом. Именно она обеспечивает биологическую полноценность и оптимальность развития культивируемых в ней организмов. Основами питательных сред традиционно являются гидролизаты, которые готовятся из продуктов животного и растительного происхождения. В связи со сложной экологической обстановкой и антропогенным воздействием на окружающую среду в продуктах животного и растительного происхождения могут содержаться антибиотики, химикаты, нитраты, токсические продукты, что отрицательно отражается на культивировании промышленных штаммов. Кроме того, содержание биологически активных веществ в сырьевых субстратах не всегда стабильно и зависит от условий культивирования, хранения или периода жизнедеятельности живого объекта, используемого в качестве сырья, что, на наш взгляд, требует дополнительных технологических манипуляций, позволяющих повысить активность, унифицировать и оптимизировать состав и качество заготовленного сырья. Практика показывает, что многие предприятия биологической промышленности, использующие среды из традиционного сырья, в частности мясного, часто испытывают серьезные затруднения, связанные со снижением объема нарастаемой бактериальной массы, необходимой для производства препаратов. Большая часть питательных сред вследствие снижения

¹ Лаборатория биологически активных веществ и новых материалов, Южный научный центр Российской академии наук, Ставрополь.

² Ставропольский государственный университет, Ставрополь.

³ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь.

качества сырья для белковой основы на современном этапе требуют модификации, заключающейся в добавлении питательных компонентов, стимуляторов роста, витаминов. Бурное развитие промышленной микробиологии и биотехнологии в последние десятилетия требует постоянного совершенствования питательных сред, разработки оптимальных технологических режимов для получения максимального выхода необходимой биомассы микроорганизмов.

Изложенное выше обуславливает актуальность важнейших направлений в современной микробиологии и биотехнологии, конкретизированных в поставленных нами задачах:

1) изыскание экологически чистого и дешевого сырья для гидролизата, используемого при конструировании питательных сред;

2) выбор рациональных технологических подходов к приготовлению гидролизата, обеспечивающих его оптимальные биологические показатели;

3) совершенствование рецептур питательных сред, направленное прежде всего на универсальность.

В качестве субстрата для гидролиза мы использовали молоки лососевых рыб, поскольку этот продукт исключает или сводит к минимуму отрицательные факторы, которые могут присутствовать в мясе (антибиотики, нитриты, токсины и др.). Во время массового лова рыбы молоки лососевых рыб зачастую являются второстепенным продуктом, получаемым в достаточно больших объемах и не всегда подвергаемым технологической переработке. Молоки содержат уникальный набор белков и аминокислот, необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов. На поздних стадиях сперматогенеза у лососевых и родственных им рыб в ядрах клеток семенников появляется протамин – спермо-специфический белок с низкой молекулярной массой и большим содержанием аргинина. Из спермы рыб можно выделить большое количество протаминов, таких как сальмин, клупеин и шуран. Снижение количества белка в мышцах в нерестовый период связано с тем, что часть белков мышц участвует в формировании белковых продуктов половых органов [5]. Все это обеспечивает высокую активность гидролизата как белковой основы питательных сред.

В составе молок также обнаружен комплекс витаминов [5], большая часть которых сохраняется в составе основы после процесса гидролиза и обладает высокой биологической и каталитической активностью при культивировании микроорганизмов.

С учетом актуальности поставленной задачи, направленной прежде всего на необходимость приготовления основ для микробиологических питательных сред из недорогого, эффективного и экологически чистого сырья, нами была разработана схема биотехнологического процесса получения гидролизата, состоящая из трех стадий:

1) отбор и подготовка субстрата;

2) активация молок лососевых рыб для оптимизации и унифицирования состава сырья по набору и количеству биологически активных веществ;

3) разработка технологии получения гидролизатов.

Подготовка субстрата заключалась в отборе молок на поздней стадии сперматогенеза с учетом их массы и целостности. Активация свежих молок рыб осуществлялась путем помещения их в темную холодильную камеру на срок, соответствующий технологии и обеспечивающий повышение биологической активности ткани за счет накопления биогенных стимуляторов, в числе которых ведущую роль мы отводим органическим кислотам и низкомолекулярным белкам. При использовании молок некоторых видов рыб (лососевые) допускается их заморозка (учитывая географический аспект и время доставки сырья), что исключает вторую технологическую стадию.

Третья технологическая стадия – собственно гидролиз. Нами апробированы различные методы гидролиза (ферментативный, кислотный, щелочной). Было приготовлено шесть вариантов гидролизатов по различной рецептуре, четыре из которых ферментативные.

Приготовление ферментативной питательной основы по первому рецепту заключалось в следующем. Молоки лососевых рыб после размораживания заливали дистиллированной водой, доводили до кипения и проваривали в течение 10 мин. Затем смесь охлаждали до 45 °С, молоки измельчали, бульон подщелачивали Na_2CO_3 до pH 7,8–8,2. Ингредиенты помещали в стеклянный баллон, добавляли поджелудочную железу КРС и помещали в термокамеру при температуре 37 °С. Выдерживали 5 суток, встряхивая 3–4 раза в день. Затем добавляли пепсин и оставляли еще на 10 суток при температуре 37 °С. После этого добавляли 1%-ный раствор HCl, кипятили в течение 30 минут и фильтровали. Хранили при температуре от 2 до 8 °С. Аминный азот составил 252 мг%.

Второй рецепт приготовления ферментативного гидролизата осуществляли следующим образом: молоки соединяли с дистиллированной водой, при помешивании нагревали до 80 °С, добавляли раствор Na_2CO_3 , охлаждали до 45 °С,

добавляли трипсин и помещали на 10 суток в термокамеру при температуре 37 °С, часто перемешивали, после этого добавляли 80 мл 1%-ного раствора HCl и фильтровали. Аминный азот составил 518 мг%.

При приготовлении третьего варианта ферментативного гидролизата использовали желчь. Свежие молоки в количестве 0,5 кг заливали дистиллированной водой, добавляли трипсин, желчь, устанавливали pH 7,8–8,0 путем добавления натрия углекислого. Переваривание происходило при температуре 37 °С в течение 10 суток. Через сутки после добавления фермента корректировали реакцию среды, доводя pH до исходного. Первые двое суток перевар тщательно перемешивали каждые 2 ч. По окончании переваривания массу фильтровали, добавляли хлороформ и хранили при температуре от 2 до 8 °С. Аминный азот составил 196 мг%.

По четвертому рецепту готовили панкреатический гидролизат. Молоки лососевых рыб соединяли с дистиллированной водой, доводили до кипения и проваривали в течение 10 мин. Смесь охлаждали, молоки измельчали, а бульон подщелачивали Na₂CO₃. Измельченные молоки и бульон помещали в стеклянный баллон, добавляли поджелудочную железу КРС, перемешивали и помещали в термокамеру при температуре 37 °С. Переваривание проводили в течение 10 суток при периодическом перемешивании. По окончании переваривания смесь фильтровали через бумажный фильтр. В фильтрат добавляли хлороформ и хранили при температуре от 2 до 8 °С. Аминный азот в готовом гидролизате составил 364 мг%.

Кислотный гидролизат молок лососевых рыб изготавливали следующим образом: свежие молоки заливали 1%-ным раствором соляной кислоты, выдерживали в автоклаве в течение 1,5 ч. Аминный азот составил 310,3 мг%.

Для приготовления щелочного гидролизата свежие молоки соединяли с раствором NaOH. Помещали в термокамеру при температуре 45 °С на 15 суток, затем смесь фильтровали. Аминный азот составил 135,3 мг%.

Дополнительные исследования подтвердили, что в ферментативном гидролизате, приготовленном по первому рецепту, отмечены наиболее оптимальные (по сравнению с кислотным и щелочным) количественные и качественные показатели аминокислотного состава: аргинин, серин, глицин, пролин, метионин, валин. В пробах этого гидролизата присутствуют органические кислоты: лимонная, яблочная, янтарная, аскорбиновая, пировиноградная. Анализ оп-

ределения углеводов показал содержание глюкозы, лактозы и гликогена. В нем содержится также комплекс макро- и микроэлементов: Zn, Cu, Fe, Na, K, Mg, Ca. В состав гидролизата входят жизненно необходимые витамины: тиамин (B1), никотиновая кислота (PP), аскорбиновая кислота (C), витамин A. Богатый состав подтверждает его биологическую полноценность, что является главным требованием к гидролизатам, используемым в качестве основы питательных сред.

Именно этот вариант ферментативного гидролизата использован нами как основа при разработке рецептуры новой питательной среды. В качестве исходной использовали рецептуру приготовления традиционной простой среды общего назначения – агара Хоттингера, в которой мясная основа была полностью заменена на новую. Такой подход, по нашему мнению, обеспечивает снижение себестоимости питательной среды при сохранении ее универсальности.

Ферментативный гидролизат молок лососевых рыб разбавляли дистиллированной водой до показания аминного азота 0,14 мг% – 480 мл; натрий хлористый – 5,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный – 4,0; дистиллированная вода – остальное, нагревали до 60 °С, затем добавляли 20% NaOH до pH 8,2 и 2% активированного угля марки «ОУ-А» к объему, кипятили в течение 10 мин. Фильтровали через фильтровальное полотно и двенадцать слоев фильтровальной бумаги, в прозрачный и охлажденный фильтрат добавляли агар микробиологический 12,0; варили 10 мин.

Измеряли pH, значение которого соответствовало $7,3 \pm 0,2$. При отклонении значения pH от заданного показателя его корректировали с помощью 20%-ного раствора натрия гидроокиси (если pH ниже заданного значения) или раствором соляной кислоты в разведении 1:1 (если pH выше заданного значения). Затем добавляли сульфит натрия 0,04 г/л (400 мг). Профильтрованный агар должен быть прозрачным (определение проводят визуально). Агар разливали во флаконы, подвергали стерилизации при 0,5 атм. в течение 30 мин.

На питательные среды были засеяны культуры тест-штаммов: *S. flexneri* 1a 8516; *S. typhi* H-901; *S. faecalis*-602; *Y. pestis* EV; *P. aeruginosa* 27/99; *S. marcescens*-1; *Lactobacterium*-СП; *E. coli* CA-18. На новой питательной среде, по сравнению с агаром Хоттингера, культуральные и морфологические свойства этих микроорганизмов были более выраженными (рис. 1, 2).



Рис. 1. Колонии *Escherichia coli*. Слева – массовый рост, крупные колонии при выращивании на питательной среде с добавлением гидролизата из молок лососевых рыб; справа – слабый рост, единичные колонии при выращивании на обычной среде



Рис. 2. Колонии *Serratia marcescens*. Слева – интенсивное окрашивание колоний при выращивании на питательной среде с добавлением гидролизата из молок лососевых рыб; справа – отсутствие интенсивного окрашивания при выращивании на агаре Хоттингера

С учетом различий в классификационной принадлежности тестовых микроорганизмов, в том числе по отношению к окраске по Грамму, полученные результаты свидетельствуют о сохранении универсальности новой питательной среды на основе гидролизата из молок лососевых рыб при значительном повышении ее ростовых качеств. Следует отметить, что ориентировочный расчет экономической эффективности представ-

ленной разработки свидетельствует о том, что питательная среда на основе молок в три раза дешевле, чем приготовленная по традиционной рецептуре на основе мясного гидролизата.

Таким образом, рекомендуемые подходы к разработке основы для новых питательных сред позволили подтвердить эффективность применения в качестве доступного, экономически целесообразного сырья молок лососевых рыб, что

открывает широкие перспективы для их целевого использования в промышленной и экспериментальной микробиологии и биотехнологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тутов И.К., Ситков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов: Уч. пос. Ставрополь, 1997. 253 с.
2. Ахапкина А.Г., Блинкова Л.П. Питательные среды как искусственная среда роста и развития микроорганизмов // Микробиология. 2001. № 6. С. 99–108.
3. Виноградова И.Н. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней. М.: Медицина, 1973. 196 с.
4. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. 394 с.
5. Лавровская Н.Ф. Современные исследования по биохимии рыб. М., 1973. 99 с.
6. Субботин В.В., Конопаткин А.А. Биотехнологические основы промышленного культивирования микроорганизмов: Проблемная лекция для студентов / Московский государственный университет прикладной биотехнологии. М., 2001. 28 с.

RATIONAL APPROACHES TO DEVELOPMENT OF NEW NUTRIENT MEDIUMS FROM ECOLOGICALLY CLEAN RAW MATERIALS

L.D. Timchenko, I.N. Tkachenko, L.S. Katunina

Rational approaches to the development of new nutrient media from the ecologically clean raw materials are used. The technology of the preparation of nourishing bases from the milt of Salmonidae fishes on different formula is developed. On the basis of hydrolyzates new nutrient media, to which there were sown of culture 8 test-strains are designed. The cultural and morphological properties of all microorganisms most vividly appeared on nutrient medium, which contains fermentative hydrolyzate with the use of the pancreas KRS and the pepsin.

REFERENCES

1. Tutov I.K., Sit'kov V.I. 1997. *Osnovy biotekhnologii veterinarnykh preparatov. Uchebnoe posobie.* [Fundamentals of biotechnology veterinary drugs. Textbook]. Stavropol: 253 p. (In Russian).
2. Akhapkina A.G., Blinkova L.P. 2001. [Culture media as an artificial environment for the growth and development of micro-organisms]. *Mikrobiologiya.* (6): 99–108. (In Russian).
3. Vinogradova I.N. 1973. *Rukovodstvo po mikrobiologicheskoy diagnostike infektionnykh bolezney.* [Guidelines for microbiological diagnosis of infectious diseases]. Moscow, Meditsina Publ.: 196 p. (In Russian).
4. Labinskaya A.S. 1978. *Mikrobiologiya s tekhnikoy mikrobiologicheskikh issledovaniy.* [Microbiology and microbiological research technique]. Moscow, Meditsina Publ.: 394 c. (In Russian).
5. Lavrovskaya N.F. 1973. *Sovremennye issledovaniya po biokhimii ryb.* [Current research on the biochemistry of fish]. Moscow: 99 p. (In Russian).
6. Subbotin V.V., Konopatkin A.A. 2001. *Biotechnologicheskie osnovy promyshlennogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov. Problemnaya lektsiya dlya studentov.* [Biotechnological bases of industrial cultivation of microorganisms. Problem lectures for students]. Moscow, Moscow State University of Applied Biotechnology: 28 p. (In Russian).