

УДК 57. 044 579. 22 861

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ТРАНСФОРМАЦІЇ ВІДХОДІВ ГАМАГЛОБУЛІНОВОГО ВИРОБНИЦТВА У ФОРМУ, ДОСТУПНУ ДЛЯ МІКРООРГАНІЗМІВ**Т.П.Осолодченко, В.М.Ніколаєнко, М.Г. Божко, В.М.Щетініна, Л.Г.Штикер
Інститут мікробіології і імунології ім. І.І.Мечникова АМН України, Харків**

Більшість відомих живильних середовищ, незважаючи на різноманітність інгредієнтів, що до них входять, можуть бути приготовані на єдиних білкових основах. Наявність стандартних білкових основ, що забезпечують фізіологічні потреби мікроорганізмів, дозволяють одержувати ідентичні за фізико-хімічними і біологічними характеристиками спеціалізовані живильні середовища. При цьому забезпечення біологічних потреб різних бактерій здійснюється шляхом збагачення білкових основ набором стандартних інгредієнтів, в першу чергу, вітамінами, факторами росту і ін. [1].

В останні десятиріччя як перспективна сировина для живильних середовищ розглядувалась кров тварин та людей та відходи виробництв, в яких вона використовується.

Аналіз літератури показує, що розвиток науки про живильні середовища в останні роки відбувається в таких напрямках:

- пошук білкових живильних основ;
- пошук стимуляторів росту;
- розробка селективних середовищ для виділення та ідентифікації мікроорганізмів;
- розробка середовищ для одержання окремих речовин мікробного походження (антигенів, токсинів, ферментів тощо), пошук шляхів підвищення їх ефективності.

При виборі сировини для приготування живильних мікробіологічних основ велике значення має можливість її швидкої і легкої трансформації у форму, доступну для культивування мікроорганізмів.

Мета даної роботи – розробка методів трансформації відходів гамаглобулінового виробництва у форму, доступну для мікроорганізмів.

Матеріали і методи

В роботі використовували фракцію ІУ гамаглобулінового виробництва, одержану із Харківської обласної станції переливання крові, підшлункову залозу великої рогатої худоби, одержану з Роганського м'ясокомбінату.

Вміст загального, білкового та безбілкового азоту визначали за уніфікованими методами [5], амінного азоту – формол-титриметричним методом Серенсена [5], пептону – за уніфікованим методом [9]. Кількість триптофану та іонів Fe^{2+} визначали за методами, рекомендованими Фармакопеею України [10].

Фракція ІУ гамаглобулінового виробництва являє собою суміш білків плазми крові і має вигляд пластиліноподібної маси білого кольору. Для одержання із неї живильної основи було вирішено використати переварювання підшлунковою залозою великої рогатої худоби. Кислотний гідроліз ми вважали недоцільним в

даному випадку, оскільки при цьому відмічається втрата циклічних амінокислот триптофану та гістидину. В основу технології одержання живильної основи із фракції IV було покладено роботу Зоріної Л.М. і соавт. [2].

Фракцію IV відварювали, занурюючи невеликі шматочки її (20-30 г) в киплячу дистильовану воду, доводили знову до кипіння і витримували в киплячому стані 30 хвилин. Відварену масу охолоджували повітряним охолодженням і перемелювали на побутовій м'ясорубці 2 рази. Одержаний фарш поміщали в скляні бутілі, розбавляючи дистильованою водою в різному співвідношенні і вносили перемелену на м'ясорубці підшлункову залозу великої рогатої худоби, після чого установлювали рН суміші рівним 7,8 - 8,0 (оптимум дії підшлункової залози) шляхом внесення 20 %-ного лугу NaOH. Для пригнічення мікрофлори добавляли 1% хлороформу. Суміш закривали гумовим корком і поміщали в термостат при $t = 40 - 45^{\circ}$. Через 24 години рН суміші підводили до 7,8 - 8,0, через 48 годин суміш збовтували. Через 72 години суміш стає прозорою, її кип'ятили 5 - 10 хвилин для інактивації ферментів, фільтрували через паперовий фільтр «червона стрічка». Стерилізацію одержаної основи проводили в автоклаві 30 хвилин при $t = 120^{\circ}$, після чого визначали хімічні характеристики одержаної основи.

Для того, щоб з'ясувати оптимальні умови цього процесу, були проведені досліди за схемою, в якій варіювали вихідну кількість фаршу із фракції IV; про активність переварювання судили за кількістю амінного азоту в кінці досліду, прозорістю одержаної основи та здатністю до фільтрування через фільтр «червона стрічка».

Результати та обговорення

Найкраща якість основи, оцінювана за показниками ступеня розщепленості вихідної сировини, накопичення амінного азоту та за фізичними властивостями, відмічається при початковій концентрації основи 5 – 15 % і підшлункової залози 8 %. При підвищенні вмісту вихідної сировини та підшлункової залози хоч одержуються добрі показники загального та амінного азоту, але підвищується каламутність суміші, що робить її непридатною для фільтрації. В зв'язку з цим для подальшої роботи були визнані оптимальними концентрація вихідного субстрату 5 – 15 %, а підшлункової залози 8 %, як описано в роботі Зоріної і ін. [2] (табл.1).

Таблиця 1 - Характеристики живильних основ, одержаних при варіюванні вихідної концентрації фракції IV, при переварюванні підшлунковою залозою

Концентрація фаршу фракції IV, %	Концентрація підшлункової залози, %	Прозорість основи, колір	Здатність до фільтрації	Концентрація азоту, мг %		
				Загальний	Амінний	Ступень розщепленості, %
1	2	3	4	5	6	7
5	8	Прозора, св.-жовтий	Добре фільтрується	282	189	66
5	8	-//-	-//-	225	189	80,3
10	8	-//-	-//-	280	224	100
15	8	-//-	-//-	248	240	100

1	2	3	4	5	6	7
20 витримка в термо-статі 7 діб	10	Каламутна, темно- жовтий	Важко фільтрується	616	535	86
30 витримка в термо-статі 7 діб	15	Каламутна, майже коричневий	-//-	392	283	72

З літератури відомо, що підшлункова залоза є джерелом ферменту амілази, який, діючи на крохмаль, зумовлює його розпад до мальтози (дванадцятиперстна кишка та тонкий кишечник) [3]. Ця обставина дає можливість одержання основ, збагачених вуглеводними компонентами, зокрема мальтозою, яка вноситься в живильні середовища для культивування дифтерії [4].

Для одержання живильної основи, збагаченої вуглеводними компонентами, в бутилі вносили 100 г фаршу фракції IV, приливали 1л дистильованої води, нагрітої до $t = 50^\circ$. В приготовану суспензію вносили 3,0 г картопляного крохмалю, 80 г підшлункової залози та 10 мл хлороформу. рН суміші встановлювали рівним 7,9 (рН оптимум амілази підшлункової залози) добавкою 20 %-ного лугу NaOH, після чого поміщали в термостат при $t = 45^\circ$. Через 24 години рН здвинувся в кислий бік (7,0), після чого його знову підвели до 7,9 20 %-ним лугом NaOH. Через 48 годин суміш збовтували. Через 72 години суміш стає прозорою, її кип'ятили і відфільтрували через паперовий фільтр «червона стрічка» з послідуною стерилізацією в автоклаві 20 хвилин при $t = 120^\circ$. Одержана основа була проаналізована на вміст загального та амінного азоту (табл.2).

Таблиця 2 - Загальний та аміний азот живильної основи, одержаної при переварюванні фракції IV в присутності крохмалю

Серія	N загальний, мг %	N аміний, мг %	Ступінь розщепленості, %
1	832	332,5	40,0
2	787	353,0	44,8
3	1222	304,5	25,0
4	980	325,0	33,16
5	1180	420,0	35,6

Як видно із таблиці 2, живильна основа, одержана в присутності крохмалю, має високі показники амінного і загального азоту, хоча ступінь розщепленості дещо нижчий, ніж у основи без крохмалю.

Одержані основи були проаналізовані також на присутність в них іонів Fe^{2+} , триптофану, безбілкового азоту та пептонів (табл. 3).

Як видно із приведених даних, одержані основи за взятими показниками порівняні з одержаними з м'ясної сировини. Звертає на себе увагу високий вміст іонів Fe^{2+} . Надалі при конструюванні живильних середовищ для мікроорганізмів, яким заважають іони Fe^{2+} , ми позбавлялись від них осадженням фосфатною сумішшю і одержували основи без домішок Fe^{2+} . Одержані основи дещо відрізняються від одержаних із м'яса за показниками кількості триптофана (у МПБ - 70 – 120 мг %).

Таблиця 3 - Деякі показники хімічного складу живильних основ, одержаних із фракції IV гамаглобулінового виробництва

Показник	Основа без крохмалю	Основа з крохмалем
Fe ²⁺ , мкг/мл	(6,2 ± 2,1)	(4,8 ± 1,3)
Триптофан , мкг/мл	(3,46 ± 1,3)	(3,52 ± 1,8)
Безбілковий аміний азот, мг %	(150 ± 12,3)	(158 ± 11,5)
Пептон, мг/мл	(9,2 ± 1,7)	(14,5 ± 2,8)

Однією із характерних особливостей основи, одержаної в присутності крохмалю, є не досить високий ступінь її розщепленості, що свідчить про наявність уламків білків (пептидів), які не охарактеризовані. В зв'язку з цим була проведена гель-хроматографія цієї основи на сефадексі G75 з метою орієнтованої характеристики їх молекулярної маси. Досліджувані зразки основи елюювалися в низькомолекулярній області, якій відповідає розрахункове значення молекулярної маси 1465 - 1500.

Таким чином, із фракції IV гамаглобулінового виробництва одержано два види живильних основ:

1. основа з високим ступенем розщепленості;
2. основа, збагачена вуглеводними компонентами, з невисоким ступенем розщепленості, яка містить пептиди з молекулярною масою порядку 1465 – 1500.

Література

1. Артеменко В.Д., Ненашев В.П., Очкина Н.И., Арзумянн И.О. и др. Рациональный способ использования побочных продуктов сыровоточного производства // Разработка и стандартизация бактериологических питательных сред.- М.: 1980.- С. 26-29.
2. Исаева З.А. Разработка метода контроля питательных сред на основе изучения процесса культивирования микроорганизмов.: Автореф. дис. ... канд.мед.наук. – Москва, Московский НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 1979. – 20 с.
3. Зорина Л. М., Рузаль Г.И., Исхакова С.Х., Сайфутдинов Ф.Г. Использование отходов производства препаратов крови для получения питательных сред // Актуальные вопросы микробиологии, эпидемиологии и иммунологии инфекционных болезней. – Харьков, 1987. – 195 с.
4. Фердман Д.Л. Биохимия .-М.: Высшая школа, 1966. – 643 с.
5. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования.- М.: Медицина, 1982. - 464 с.
6. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. - 33с.
7. Филлипович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. – М., Просвещение, 1975. – 318 с.
8. Бэйли Дж. Методы химии белков. М.: Мир, 1965. – 318 с.
9. Св. Бырдаров .Экспериментальная микробиология . – София: Медицина и физкультура, 1965. – 485 с.
10. Державна фармакопея України.- Київ, 2000 р. – 500 с.

Резюме

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ТРАНСФОРМАЦІЇ ВІДХОДІВ ГАМАГЛОБУЛІНОВОГО ВИРОБНИЦТВА У ФОРМУ, ДОСТУПНУ ДЛЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Розроблено режими одержання живильних основ шляхом переварювання відходів гамаглобулінового виробництва (фракція № 4) підшлунковою залозою, які дозволяють отримати форми, доступні для мікроорганізмів. Показана можливість використання їх для конструювання живильних середовищ

Ключеві слова: живильні основи, відходи виробництва, конструювання середовищ, культивування

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ТРАНСФОРМАЦИИ ОТХОДОВ ГАММАГЛОБУЛИНОВОГО ПРОИЗВОДСТВА В ФОРМУ ДОСТУПНУЮ ДЛЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Разработаны режимы получения питательных основ путём переваривания отходов гамаглобулинового производства поджелудочной железой, позволяющие получить питательные формы, доступные для микроорганизмов. Показана возможность их использования для конструирования питательных сред.

Ключевые слова: питательные основы, отходы производства, конструирование сред, культивирование

WORKING OUT METHODS FOR TRANSFORMATION WASTE OF GAMAGLOBULIN MANUFACTURE IN FORM WHICH ACCESSIBLE FOR BACTERIUMS

Receiving regimes of nutrient basis in the way overdoing waste gamaglobuline manufacture of pancreas which let to get nutrient forms for microorganisms was worked out. You can see possibility of their using constructions of nutrient mediums.

Key words: nutrient basis, waste of manufacture, construction of mediums, cultivation