

Ю.С.Ковтун, А.А.Курилова, Т.В.Таран, Л.С.Катунина, Н.В.Чурикова

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ ОСНОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь,
Российская Федерация

Целью работы является сравнительная оценка использования панкреатических гидролизатов белковых продуктов растительного и животного происхождения в качестве питательной основы микробиологических сред. В качестве исходного сырья использовали: желатин, сою, соевый концентрат, глютен кукурузный, рыбную кормовую муку, кильку каспийскую, кровь КРС. Гидролиз белкового сырья, очистку гидролизатов и их контроль по физико-химическим показателям проводили общепринятыми методами. Определение биологических показателей пептонов осуществляли на модели питательного агара с помощью тест-штаммов *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* «S form», *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1. Определены физико-химические показатели исследуемых гидролизатов. Выявлены различия в количестве, диаметре и частоте диссоциации колоний *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* «S form», пигментообразовании *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 и *Serratia plymuthica* 1 на агаровых средах с изучаемыми гидролизатами. Получены сравнительные данные физико-химических и биологических показателей исследуемых гидролизатов, что позволит дифференцировать их применение в составе бактериологических питательных сред.

Ключевые слова: гидролизат, питательная среда, физико-химические показатели, биологические показатели, пигментообразование.

Yu.S.Kovtun, A.A.Kurilova, T.V.Taran, L.S.Katunina, N.V.Churikova

Comparative Assessment of Prospective Protein Bases for Microbiological Media

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Objective of the work is to carry out comparative assessment of the pancreatic hydrolysates of protein-containing products, both phylogenous and zoogenous, as nutrient base for microbiological media. Gelatine, soy, soy concentrate, maize gluten, fish meal, common kilka, and bovine blood have been used as a feedstock. Protein stuff hydrolysis, hydrolysate purification, and validation of physical-chemical properties were performed in accordance with conventional techniques. Testing of peptone biological parameters has been carried out on the model of nutrient agar using *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* "S form", *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1 test strains. Identified have been physical-chemical parameters of the hydrolysates under study. Detected are the variations in quantity, diameter and frequency of dissociation among the colonies of *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* "S form", chromogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1, cultivated on agar media with hydrolysates under study. Obtained are the comparative data on physical-chemical and biological parameters of all experimental hydrolysates, which offers an opportunity to differentiate their choice when adding them into bacteriological nutrient media.

Key words: hydrolysate, nutrient media, physical-chemical parameters, biological parameters, chromogenesis.

Производство питательных сред в России до недавнего времени основывалось на использовании панкреатического гидролизата каспийской кильки, ферментативных и кислотных гидролизатов казеина, пептона ферментативного и панкреатического гидролизата кормовых дрожжей. В 90-х годах XX века начался выпуск ферментативного гидролизата рыбной муки и сред на его основе. Примерно в это же время было прекращено промышленное производство кормовых дрожжей и, как следствие, соответствующего гидролизата.

Несмотря на универсальность применения мясных, рыбных и казеиновых гидролизатов, отработанность и относительную простоту методов их получения, в ряде случаев целесообразным является использование альтернативных источников сырья. На это, в частности, указывает обязательное наличие растительных и дрожжевых гидролизатов (автоли-

затов) в перечне продуктов всех крупных компаний, специализирующихся в области выпуска питательных сред. Что касается ассортимента гидролизатов, выпускаемых зарубежными компаниями, следует отметить и их разнообразие: обычно 4–5 наименований мясных пептонов, столько же – казеина и других производных молока, 1–2 и более – растительных, 2–3 продукта, представляющих собой смеси различных пептонов или продукты, состав которых не раскрывается [2, 3, 4]. Наличие достаточного количества различных гидролизатов позволяет оптимизировать состав питательных сред как по экономичности, так и по качественным параметрам, что является определяющим.

Таким образом, значимым направлением в области разработки микробиологических питательных сред продолжает оставаться поиск сырья для получения белковых гидролизатов, не уступающих мясным

по биологическим свойствам.

Одним из гидролизатов, сфера применения которого в последнее время существенно расширилась, является гидролизат желатина. Данный продукт входит в состав нескольких сред для культивирования анаэробов, выпускаемых с недавнего времени фирмой «Oxoid» [4]. Вместе с тем фирмы «Merck», «Laboratorios Conda, S.A.», также выпускающие аналогичные пептоны и питательные среды их содержащие, рекомендуют использовать данные гидролизаты, главным образом, для культивирования неприхотливых микроорганизмов [3]. Поэтому представляет интерес сравнение качественных показателей гидролизата желатина с показателями переваров, полученных из других продуктов.

При получении гидролизатов растительного белка нередко возникают определенные технологические затруднения в связи с необходимостью измельчения исходного сырья, сложностью освобождения от значительных количеств балластных веществ, в ряде случаев – из-за наличия ингибиторов протеаз [1]. Поэтому перспективным и более экономичным является использование не самого сырья, а продуктов его переработки, в которых повышено относительное содержание протеина за счет существенного уменьшения концентрации крахмала, липидов и антипитательных веществ. В частности, к таким продуктам относятся соевый концентрат и глютен кукурузный.

Соевый концентрат представляет собой очищенный белковый продукт, содержащий 60–62 % сырого протеина. Он получен из обезжиренного соевого шрота, освобожденного от растворимых сахаров в процессе спиртовой экстракции.

Глютен кукурузный – это сыпучий порошок, состоящий из белка кукурузного зерна, отделенного от крахмала, применяется в качестве высокобелковой добавки в кормопроизводстве. Содержит не менее 55–60 % протеина, богатый комплекс микроэлементов, жиро- и водорастворимых витаминов: E, B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆. Белок кукурузного глютена отличается высоким содержанием серосодержащих аминокислот – метионина и цистина.

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилась сравнительная оценка использования в качестве белковой основы питательных сред гидролизатов желатина, сои, соевого концентрата и глютена. В качестве препаратов сравнения использовались гидролизаты кильки, крови крупного рогатого скота (КРС) и рыбной муки.

Материалы и методы

Для определения биологических показателей моделей питательных сред использовали тест-штаммы бактерий *Shigella flexneri* 1a 8516, *S. sonnei* «S form», *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Для получения гидролизатов использовали: в качестве исходного сырья – желатин (ГОСТ 11293-89, марка П-11), сою (ГОСТ 17109-88), соевый концентрат, глютен кукурузный (ТУ 9189-001-52562523-02), рыбную кормовую муку (ГОСТ 2116-2000), кильку каспийскую свежемороженую, кровь КРС; в качестве фермента – поджелудочную железу (ГОСТ 11285-93). При приготовлении питательных сред использовали агар микробиологический (ГОСТ 17206-96), натрия хлорид (ГОСТ 4233-77), воду дистиллированную (ГОСТ 6709-72). Кильку, кровь КРС и семена сои предварительно измельчали.

Гидролиз сырья вели в течение 24 ч при температуре 37–40 °С, гидромодуле 1:9 (в пересчете на сухое вещество), концентрации поджелудочной железы 50 % от массы сырья и рН, установленном на уровне (8,0±0,2) с помощью 20 % раствора гидроокиси натрия. Через 2 ч от начала ферментации в гидролизную смесь добавляли 1 % хлороформа. С целью очистки и осветления гидролизных смесей проводили их обработку путем кипячения с последующей фильтрацией при рН 4,5–4,7 и 7,8–8,2.

Определение цветности 1 % по содержанию сухих веществ растворов гидролизатов осуществляли в соответствии с ФС 42-3874-99. Определение прозрачности, рН, белка, содержания пептидов, общего азота, аминного азота, хлоридов и прочности студня сред проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08. Сухой остаток в гидролизатах определяли рефрактометрическим методом. Оценку специфической активности моделей питательных сред проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08. Статистическую обработку результатов исследования проводили путем вычисления средней арифметической (M) и стандартной ошибки средней арифметической (m), используя t-критерий Стьюдента. При оценке достоверности различий сравниваемых данных за уровень значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе работы оценивалась технологичность и ориентировочная стоимость получения гидролизатов, их физико-химические и биологические показатели.

Хранение большинства видов взятого в работу сырья возможно в сухом прохладном помещении при комнатной температуре, за исключением кильки и крови КРС, которые должны храниться в морозильной камере при температуре (–18±2) °С. Специальной подготовки сырья для проведения гидролиза не потребовалось, за исключением кильки и крови КРС, которые были перемолоты на мясорубке, а также семян сои, измельченных на дисмембраторе ДМБ-250.

Гидролизаты, полученные после завершения процесса ферментации, очистки и осветления, были прозрачны, за исключением гидролизатов сои и глютена, в которых отмечалась едва заметная опалесценция. Физико-химические показатели гидролизатов после обработки представлены в табл. 1.

Сравнительная оценка физико-химических показателей панкреатических гидролизатов

Наименование показателей	Панкреатические гидролизаты						
	кильки	желатина	рыбной муки	крови	сои	соевого концентрата	глутена
Цветность	0,041±0,008	0,029±0,009	0,161±0,005	0,05±0,01	0,073±0,01	0,044±0,008	0,093±0,006
pH	7,51±0,06	7,80±0,04	7,62±0,09	7,50 ±0,05	7,47 ±0,07	7,44±0,05	7,49±0,06
Белок	+	-	+	+	+	+	-
Содержание пептидов, %	49,8±5,3	103,7±6,9	67,6±6,3	71,0±6,07	38,0±3,5	47,7±4,8	38,8±4,1
Содержание общего азота, %	0,742±0,021	1,816 ±0,042	0,908 ±0,038	0,823 ±0,038	0,478 ±0,018	0,580 ±0,012	0,682 ±0,036
Содержание аминного азота, %	0,342±0,018	0,481±0,045	0,316±0,026	0,393±0,024	0,152±0,015	0,228±0,017	0,285±0,021
Амин. N/общ. N	0,46±0,02	0,26±0,02	0,35±0,04	0,48±0,03	0,32±0,03	0,39±0,02	0,42±0,02
Содержание хлоридов (в пересчете на натрия хлорид), %	0,468 ±0,029	1,264 ±0,064	1,060 ±0,060	0,698 ±0,064	0,382 ±0,024	0,490 ±0,032	0,473 ±0,049
Сухой остаток, %	5,53±0,17	11,31±0,87	8,26±0,58	6,63±0,57	4,98±0,39	5,85±0,46	5,74±0,61

Цветность при визуальной оценке уменьшалась от насыщенного светло-коричневого цвета гидролизата рыбной муки до бледно-желтого – гидролизата желатина. Значение pH всех гидролизатов было слабощелочным, и при последующем изготовлении питательных агаров требовалась лишь незначительная коррекция данного показателя. Отсутствие следов белка фиксировалось только в гидролизатах желатина и глутена, в остальных продуктах качественная реакция на белок была положительной, особенно выраженной она была в гидролизатах рыбной муки.

Содержание пептидов было наибольшим в гидролизате желатина (103,7 %) и превышало аналогичный показатель пептона ферментативного по ГОСТ 13805-76, принятый за 100 %. Концентрация пептидов в остальных гидролизатах, полученных из сырья животного происхождения, колебалась в пределах от 49,8 до 71 % и превышала аналогичные показатели растительных пептонов (38,0–47,7 %). Содержание общего и аминного азота в гидролизатах сырья животного происхождения (кильки, желатина, рыбной муки, крови) было выше, чем в гидролизатах растительного сырья. Содержание сухих веществ варьировало от 4,98 (гидролизат сои) до 11,31 % (гидролизат желатина).

Биологические показатели изготовленных ги-

дроллизатов были изучены на модели питательного агара следующего состава: гидролизат из расчета содержания в 1 л среды 12 г сухих веществ; натрия хлорид с учетом вещества, содержавшегося в гидролизате, вводили до содержания его в среде 5 г/л; агар микробиологический добавляли в количестве, обеспечивающим прочность готовой среды (340±40) г., pH агара устанавливали в пределах (7,2±0,1).

После кипячения среды, содержащие гидролизаты сои и глутена, стали опалесцировать, прочие оставались прозрачными. Автоклавирование при температуре 121 °С в течение 20 мин привело к выпадению осадка в средах, содержащих гидролизат глутена. Внешний вид других сред оставался без изменений. Опалесценция агара, содержавшего гидролизат сои и агара, включавшего гидролизат глутена, после перемешивания осадка не превышала 5 единиц по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей (ОСО 42-28-86).

Данные о количестве, диаметре и морфологии колоний *S. flexneri* 1a 8516 и *S. sonnei* «S form», пигментообразовании штаммов *P. aeruginosa* 27/99 и *S. plymuthica* 1 через 20 ч инкубации при температуре (37±1) °С, представленные в табл. 2, показывают, что по количеству выросших колоний *Shigella flexneri* 1a 8516 изучаемые среды значимо не отличались

Таблица 2

Сравнительная оценка биологических показателей панкреатических гидролизатов

Тест-штаммы	Наименование показателей	Питательные агары на основе панкреатических гидролизатов						
		кильки	желатина	рыбной муки	крови	сои	соевого концентрата	глутена
<i>S. flexneri</i> 1a 8516	Кол-во колоний из разведения 10 ⁻⁶	53,73±2,07	46,02±3,11	55,1±2,86	52,31±2,46	54,87±1,91	57,04±3,70	56,97±2,97
	Диаметр колоний, мм	1,3–2,5	0,5–1,0	1,2–2,4	1,0–2,0	1,1–2,3	1,2–2,4	1,1–2,0
	Форма колоний	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии
<i>S. sonnei</i> «S form»	Кол-во колоний из разведения 10 ⁻⁶	48,45±1,29	48,48±2,88	49,30±1,73	38,64± 2,82	46,78±1,93	60,78±2,31	57,66±2,48
	Диаметр колоний, мм	2,0–3,0	1,2–2,0	1,5–3,0	1,5–2,5	1,5–3,5	1,5–3,5	1,5–3,0
	Форма колоний	S- и R-колонии	S-колонии	S-колонии	S- и R-колонии	S- и R-колонии	S- и R-колонии	S- и R-колонии
<i>P. aeruginosa</i> 27/99	Окраска газона	Зеленая	Серо-голубая с зеленым оттенком	Серо-коричневая	Сине-зеленая	Серо-коричневая	Серо-коричневая	Серо-коричневая
<i>S. plymuthica</i> 1	Окраска газона	Оранжевая	Красно-оранжевая	Оранжево-красная	Оранжево-красная	Оранжево-желтая	Оранжево-желтая	Оранжево-красная

между собой, за исключением агара, включающего гидролизат желатина, который существенно уступал ($p < 0,05$) средам на основе других гидролизатов, за исключением гидролизата крови. Данный агар уступал остальным и по диаметру выросших колоний обоих видов шигелл. На агаре с гидролизатом крови количество выросших колоний *S. sonnei* «S form» значительно уступало ($p < 0,05$) количеству колоний данного штамма на средах с другими основами, а на агарах с гидролизатами соевого концентрата и глютенна превосходило их ($p < 0,05$).

У отдельных колоний *S. sonnei* «S form», выросших на средах, включавших гидролизаты сои, глютенна, соевого концентрата, крови, кильки, наблюдалась SR-диссоциация (степень диссоциации – 4,1, 2,4, 2,2, 1,2, 0,6 % соответственно). Наиболее выраженной она была на агаре с гидролизатом сои, где отмечалась большая волнистость края и шероховатость поверхности колоний. Штамм *S. plymuthica* 1 на всех изучаемых средах рос с образованием газона насыщенного цвета от красно-оранжевого до оранжево-желтого оттенков различной интенсивности.

Интенсивная сине-зеленая окраска *P. aeruginosa* 27/99 отмечалась на агаре, включавшем гидролизат крови, менее выраженная, с преобладанием зеленых тонов, – на агаре с гидролизатом кильки. На среде с гидролизатом желатина газон *P. aeruginosa* 27/99 был окрашен в слабо насыщенный серо-голубой цвет с зеленым оттенком. На остальных средах в окраске газона *P. aeruginosa* 27/99 преобладали серые тона с зеленовато-желтым оттенком.

Стоимость белкового сырья и поджелудочной железы, необходимых для получения 1 кг сухого вещества ферментализата, исходя из оптовых цен января 2013 г., составила для гидролизата кильки 256,5 руб., желатина – 268, рыбной муки – 191, крови – 173,6, сои – 121,5, соевого концентрата – 189, глютенна – 236.

Полученные данные свидетельствуют об удовлетворительных физико-химических показателях изученных гидролизатов и приготовленных на их основе питательных агаров, кроме питательного агара с гидролизатом глютенна. В последнем случае необходима доработка способа очистки гидролизной массы.

Касаясь оценки специфической активности изучаемых питательных сред, следует отметить, что количество и размер колоний *S. flexneri* 1a 8516 и *S. sonnei* «S form», выросших на агарах с гидролизатами кильки, рыбной муки, соевого концентрата, глютенна и сои были приемлемыми. Использование гидролизатов желатина и крови как единственных источников питательных веществ не может рассматриваться оптимальным из-за малого диаметра формирующихся колоний в первом случае и малого количества вырастающих колоний – во втором. Формирование отдельных атипичных колоний *S. sonnei* «S form» на агарах, включающих гидролизаты сои, глютенна, соевого концентрата, крови и кильки, как свидетельствует практика применения двух последних гидролиза-

тов, не может являться препятствием к их использованию, но должно учитываться при включении этих пептонов в состав питательных сред в зависимости от назначения последних.

Образование пигмента *S. plymuthica* 1 – продиозиона наблюдалось на всех исследуемых агарах, однако регламентированное требованиями к питательным агарам, изложенными в МУК 4.2.2316-08, оранжево-красное окрашивание отмечалось на средах с гидролизатами рыбной муки, крови, глютенна и желатина. Применение гидролизатов кильки, сои и соевого концентрата вызывало выработку пигментов оранжевого или оранжево-желтого цвета. Образование сине-зеленого или зеленого пигмента штаммом *P. aeruginosa* 27/99, что соответствует требованиям МУК 4.2.2316-08, выявлялось только на средах с гидролизатами крови, кильки и желатина.

Наиболее технологичными оказались панкреатические гидролизаты желатина, рыбной муки, соевого концентрата. Использование сои, кильки, крови требует размольного оборудования, а двух последних видов сырья – еще и морозильных камер. С экономической точки зрения, в качестве сырья предпочтительнее использовать сою, кровь, соевый концентрат и рыбную муку.

В данной работе мы ограничились рассмотрением некоторых вопросов получения панкреатических гидролизатов, их физико-химических и биологических показателей в отношении штаммов микроорганизмов, применяемых для оценки качества питательного агара. В дальнейших исследованиях нами предполагается изучение биологических показателей вышеупомянутых пептонов в отношении микроорганизмов других таксономических групп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Султанов З.З., Меджидов Ш.М., Меджидов М.М., Какулина Е.А., Алиев А.З., Перепелица Л.Г., Султанова Э.И. Способ получения гидролизата сои. Патент РФ 2295249, опубл. 20.03.2007 г. Бюл. 8.
2. Компоненты из растительного сырья. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.himedialabs.ru/rm-veg/> (дата обращения 28.06.2013).
3. Merck Microbiology Manual 12th Edition (2005). 688 p.
4. The OXOID MANUAL. 9th Edition. 2006. 624 p.

References

1. Sultanov Z.Z., Medzhidov Sh.M., Medzhidov M.M., Kakulina E.A., Aliev A.Z., Perepelitsa L.G., Sultanova E.I. [Method of soy hydrolysate obtainment]. RF Patent 2295249. 20.03.2007. Bull. 8.
2. [Components obtained from phylogenous feedstock]. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (India) [Internet]. [Cited 28.06.2013]. Available from: <http://www.himedialabs.ru/rm-veg/>.
3. Merck Microbiology Manual 12th Edition (2005). 688 p.
4. The OXOID MANUAL. 9th Edition. 2006. 624 p.

Authors:

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Churikova N.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 09.07.13.