

**Оценка возможности использования питательной среды на основе  
сухого гидролизата казеина в производстве холерной химической  
вакцины**

*Ю.А. Алешина, О.В. Громова, Л.Ф.Ливанова, О.С. Дуракова,  
А.Ю. Ульянов, Н.И. Белякова, К. А. Холматов, М.В. Антонычева,  
О.А.Волох*

*Российский научно-исследовательский противочумный институт  
"Микроб"*

доклад 10 мин

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире необходима специфическая профилактика этого заболевания. В 2001 году в России вакцинация против холеры была включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ Минздрава России от 27.07.2001 №229), поэтому разработка и усовершенствование современных безопасных химических вакцин против холеры важным и перспективным направлением научных исследований. Процесс культивирования лежит в основе каждого микробиологического производства, определяя его эффективность, количество и качество продуктов микробного синтеза. В настоящее время в конструировании полноценных питательных сред для выращивания микроорганизмов мясные основы уступают место казеиновым. Это сырье для изготовления питательных компонентов является более доступным, стандартным и дешевым. Традиционно в качестве переваривающего агента белкового сырья используется поджелудочная железа крупного рогатого скота. Однако в последнее время её стоимость значительно возросла и почти сравнялась со стоимостью мяса говядины. Она нестандартна по своим свойствам и требует немедленного использования или хранения при низкотемпературном режиме, процесс гидролиза сырья под её воздействием длится несколько суток. В технологии производства холерной химической таблетиро-

ванной вакцины института «Микроб» используется метод глубинного культивирования производственных штаммов на бульоне из казеина с 1% пептона. Данная среда производится в отделе питательных сред, характеризуется некоторой нестандартностью от серии к серии и требует больших материальных затрат. В этой связи внедрение в процесс производства вакцины более стандартных сред является важным и перспективным направлением научных исследований.

Цель работы – апробация эффективности использования питательной среды – бульона на основе панкреатического гидролизата казеина сухого (ГНЦ ПБМ Оболенск) в экспериментально-производственных условиях.

Эффективность жидких экспериментальных питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе Infors Multitron II и в биореакторе Biotron с автоматическим поддержанием параметров культивирования. Объем питательной среды при культивировании в колбах составлял 25 мл, температура культивирования 37 °С, скорость вращения платформы – 200 об/мин, время культивирования (24±1) ч. Параметры культивирования в биореакторе с рабочим объемом 200 л - аэрация 0,5-0,7 л воздуха на 1 л питательной среды, скорость перемешивания 500 об/мин. Регламентная питательная среда - бульон из ферментативного казеинового гидролизата рН 7,8 + 0,2, содержащий 0,2 % аминного азота, 0,1 % пептона, 0,5 % хлорида натрия и 0,05 % двузамещенного фосфата натрия при подкормке глюкозой и аммиаком. Концентрацию микробов измеряли по ОСО мутности. Забор проб бульонной культуры из реактора осуществляли через 5,6,7,8,9,10 часов роста.

Первым этапом нашей работы явилось определение количества аминного азота в питательной среде для оптимального выхода антигенов. Для этого нами были приготовлены среды с содержанием аминного азота от 40 мг% до 120%. Малообъемное культивирование производственных штаммов

*Vibrio cholerae* M41 серовара Огава и *Vibrio cholerae* 569В серовара Инаба проводилось на колбах в течение  $9 \pm 1,5$  часов на экспериментальных средах. В пробах после выращивания была определена концентрация микробных тел, выход антигенов и ферментов (Табл. 1). Как видно из таблицы, оптимальная концентрация биомассы обоих штаммов и содержание антигенов отмечалось при использовании среды с содержанием аминного азота 100 и 120 мг%. Содержание холерного токсина у штамма *V. cholerae* 569В в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) максимальным явилось также при данных концентрациях аминного азота. Поэтому для дальнейшей работы нами была выбрана среда с содержанием аминного азота 100 мг%.

Далее нами было проведено экспериментально-производственное выращивание штаммов-продуцентов в объеме 100 л в производственных ферментерах. В процессе выращивания каждый час, начиная с 5 часов роста производили отбор проб культуры, которые контролировали по мутности, содержанию О-антигена и холерного токсина (в РДП с гомологичными сыворотками) (Табл. 2). В результате сравнительного анализа выращивания производственного штамма *V. cholerae* M41 видно, что концентрация микробных тел при выращивании на экспериментальной среде была выше (37,4 млрд.), чем на регламентном казеиновом бульоне (30,8 млрд.). Что касается содержания О-антигена, то его количество было значимо выше (в 4 раза) при выращивании на экспериментальной среде. При культивировании штамма *V. cholerae* 569В концентрация микробных тел и О-антигена Инаба была однозначной (44 млрд) и титр 1:8, но содержание холерного токсина при выращивании на экспериментальной среде было значимо выше по данным реакции пассивного иммунного гемолиза (1:256 и 1:64 соответственно) и в реакции Крейга. Анализ специфических фракций, выделенных в процессе производства также показал более высокую специфическую активность как О-антигена, так и холерного токсина, что позволяет получить большее количество таблеток вакцины из экспериментального реактора.

Таким образом, сравнивая эффективность питательной среды на основе сухой стандартной основы и среды производства института «Микроб» при глубинном культивировании производственных штаммов в условиях ферментера, можно сделать вывод о перспективности использования данной среды в производстве холерной вакцины.

Последним этапом нашей работы явилась апробация новой среды для получения тест-токсина, который используется для производства антихолерогенной сыворотки и в качестве компонента реакции для определения активности специфических фракций и таблеток вакцины. Для этого мы вырастили штамм *V. cholerae* 569В в колбах и бутылках в течение 18 ч, что позволило получить бульонную культуру с концентрацией микробных тел 16 и 10 млрд соответственно. Далее мы получили стерильный фильтрат культуральной жидкости (10 л) и сконцентрировали его методом тангенциальной фильтрации последовательно через фильтры 300 кДа и 10 кДа до объема 1л. Далее токсин был осажден в изоточке в присутствии ГМФ. Этапы получения препарата показаны в таблице 3. Как видно, использование фильтра 300 кДа позволяет нам удалить значительную часть О-антигена Инаба, а на фильтре 10 кДа концентрируется холерный токсин. Полученный после осаждения, диализа и хроматографической очистки препарат тест-токсина показал высокую активность в пробе Крейга – 40000 и может быть использован для контроля.

Таким образом, нами проведена работа по испытанию в экспериментально-производственных условиях питательной среды – казеинового бульона на основе сухой основы (панкреатический гидролизат казеина сухой, производство ГНЦ ПБМ Оболенск). Показана возможность применения данной среды при экспериментальных и масштабированных выращивании в производственных условиях, а также для получения тест-токсина.