

## USE OF FLAVOROUS ADDITIVES IN CHEESE PRODUCTION TECHNOLOGY

*Kanina Ksenia Aleksandrovna, Ph.D. tech. Sciences, Senior Lecturer, Department of Technology of Storage and Processing of Livestock Products, Russian State Agrarian University - Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva, e-mail: [kseniya.kanina.91@mail.ru](mailto:kseniya.kanina.91@mail.ru)*

*Borodulin Dmitry Mikhailovich, Doctor of Engineering Sciences, Professor, Director of the Technological Institute, Russian State Agrarian University - Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, e-mail: [borodulin@rgau-msha.ru](mailto:borodulin@rgau-msha.ru)*

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Russia, Moscow, e-mail: [rector@rgau-msha.ru](mailto:rector@rgau-msha.ru)

**Annotation:** *The article provides an overview of the most popular flavoring additives for cheese making. Methods for introducing various additives during the production of cheeses, as well as their use in refining, are shown.*

**Key words:** *cheese, cheese production, flavoring additives, refining.*

---

УДК 658.5

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И ОЧИСТКИ БАКТЕРИОФАГА MS2 ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ

*Корнилова Алена Андреевна, студентка, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», e-mail: [shashkova1804@gmail.com](mailto:shashkova1804@gmail.com)*

*Машенцева Наталья Геннадьевна, д-р техн. наук, профессор, профессор кафедры Биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», e-mail: [MashencevaNG@mgupp.ru](mailto:MashencevaNG@mgupp.ru)*

ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»,  
Россия, Москва, e-mail: [mgupp@mgupp.ru](mailto:mgupp@mgupp.ru)

**Аннотация:** Одним из перспективных направлений по созданию эффективных и дешевых рекомбинантных вакцин является использование платформы для разработки на основе РНК-содержащего бактериофага MS2. В ходе работы было проведено сравнение трех методов осаждения бактериофага MS2 и оценена возможность использования этих методов для очистки вирусоподобных частиц, созданных на основе этого фага.

**Ключевые слова:** концентрирование, очистка, бактериофаг MS2, вакцина, высаливание, осаждение, вирусоподобные частицы.

Вирусоподобные частицы бактериофага MS2 представляют собой наночастицы, по форме, размеру, структуре сходные с вирусными частицами, но лишенные собственного генетического материала. Вирусоподобные частицы могут самособираться из белков оболочки в икосаэдрический капсид и могут быть использованы для доставки целевых агентов, что перспективно для разработки вакцин и средств доставки лекарств [1]. Подбор методов эффективной очистки и концентрирования вирусных частиц является актуальной задачей [2].

Цель работы – подбор методики концентрирования и очистки бактериофага MS2.

**Объекты и методы исследования.** Объект исследования – бактериофаг MS2. Предметом исследования являются методы концентрирования и очистки фага MS2.

При определении титра фага по методу Грациа готовили серию разведений бактериофага, смешивали с суспензией клеток *E. coli* и полужидким агаром, высевали на чашку Петри, культивировали 20 ч в термостате при температуре 37 °С. После этого проводили подсчет негативных колоний и определяли титр бактериофага.

При выделении и очистке фага использовали метод осаждения сульфатом аммония при концентрациях 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70 % [3]. В 1 мл фаголизата растворяли сульфат аммония и выдерживали при температуре 4 °С. Далее центрифугировали 20 мин при 6000 об/мин. Преципитат растворили в 200 мкл физиологического раствора. Далее определяли титр бактериофага MS2 в супернатанте и преципитате.

При осаждении бактериофага MS2 органическими растворителями использовали этанол 96% в концентрациях 20, 30, 40, 50 %. К 1 мл фаголизата добавляли на холоду спирт, после чего смесь помещали в морозилку на 1 сутки. Далее центрифугировали в холодном роторе 20 мин при 14,5 тыс. об/мин. Преципитат растворяли в 200 мкл физ. раствора, определяли титр фага.

В качестве двухфазной системы использовали смесь полиэтиленгликоля 6000 в концентрациях 10, 20, 30 и 40 % и 2М NaCl. Раствор ПЭГ/NaCl и фаголизат MS2 смешивали в соотношении 1:1 и выдерживали при 4 °С сутки, после чего центрифугировали 20 мин при 14,5 тыс. об/мин. Преципитат растворяли в 200 мкл физиологического раствора, определяли титр бактериофага в супернатанте и преципитате.

Для получения вирусоподобных частиц бактериофага MS2 был использован штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) RTL рЕТ-MS6, который растили на качалке до поздней логарифмической фазы при температуре 37 °С. После добавили IPTG и растили 3 ч. Следующим этапом отмывали клетки от среды физиологическим раствором, преципитат растворили в 100 мМ Tris и 100 мМ NaNO<sub>3</sub> буфере [4]. Добавляли лизоцим и инкубировали при температуре 37 °С 30 мин. После центрифугирования в супернатант добавляли соль, спирт и ПЭГ в

необходимой концентрации и выделяли вирусоподобные частицы по подобранным ранее методикам. Далее проводили ПААГ электрофорез. Размер белка капсида бактериофага MS2 равен 13,7 кДа, поэтому готовили 12,5% разделяющий и 5% концентрирующий гели.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты осаждения бактериофага MS2 сульфатом аммония представлены в таблице 1. Исходный титр бактериофага был равен  $3 \times 10^8$  БОЕ/мл.

Таблица 1

Результаты осаждения фага MS2 сульфатом аммония

Анализируемый раствор	Концентрация сульфата аммония						
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%
Титр бактериофага MS2, БОЕ/мл							
Супернатант	$5,68 \times 10^7$	$2,08 \times 10^7$	$1,31 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$7 \times 10^5$	$1,66 \times 10^7$
Преципитат	–	$1,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,16 \times 10^9$	$1,28 \times 10^9$	$9 \times 10^8$	$1,03 \times 10^9$

Данные, представленные в таблице 1, показывают, что наилучшие результаты были получены при использовании сульфата аммония в концентрации 50%, которая позволяет осадить наибольшее количество фаговых частиц ( $1,28 \times 10^9$ ). При этом в супернатантах всех образцов сохраняется достаточное количество фагов.

Результаты осаждения 96% этанолом представлены в таблице 2. Исходный титр фагового лизата равен  $4,54 \times 10^9$  БОЕ/мл.

Таблица 2

Результаты осаждения фага MS2 96% этанолом

Анализируемый раствор	Концентрация 96% этанола			
	20%	30%	40%	50%
Титр бактериофага MS2, БОЕ/мл				
Преципитат	$3,64 \times 10^9$	$1,92 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$

При осаждении фага 96% этанолом наибольший титр получили при концентрации этанола 20% ( $3,64 \times 10^9$  БОЕ/мл). Следует отметить, что осаждение вирусов данным методом нужно проводить в строгих условиях с использованием низких температур. При несоблюдении таких условий бактериофаг быстро растворяется в спирте, теряя свою активность, что влечет за собой большие

потери конечного продукта (табл. 2).

Результаты осаждения фага MS2 в двухфазной системе представлены в таблице 3. Исходный титр фагового лизата равен  $2,23 \times 10^9$  БОЕ/мл.

Из таблицы 3 видно, что при осаждении фага в двухфазной системе лучше всего удалось сконцентрировать фаг при концентрации полиэтиленгликоля 20%. Титр сконцентрированного фага MS2 равен  $5,48 \times 10^9$  БОЕ/мл. Данный метод позволяет успешно сконцентрировать бактериофаг, но при этом не требует использования жестких температурных условий.

Для осаждения и очистки вирусоподобных частиц бактериофага MS2 из клеточных лизатов *E. coli* были использованы условия, оптимальные для осаждения фаговых частиц, подобранные в ходе предыдущей работы: осаждение сульфатом аммония в концентрации 50%, осаждение этанолом в концентрации 20%, осаждение раствором ПЭГ/NaCl в концентрации 20%. Полученные результаты были проанализированы с использованием метода электрофореза в денатурирующих условиях (ПААГ электрофорез) (рис. 1).

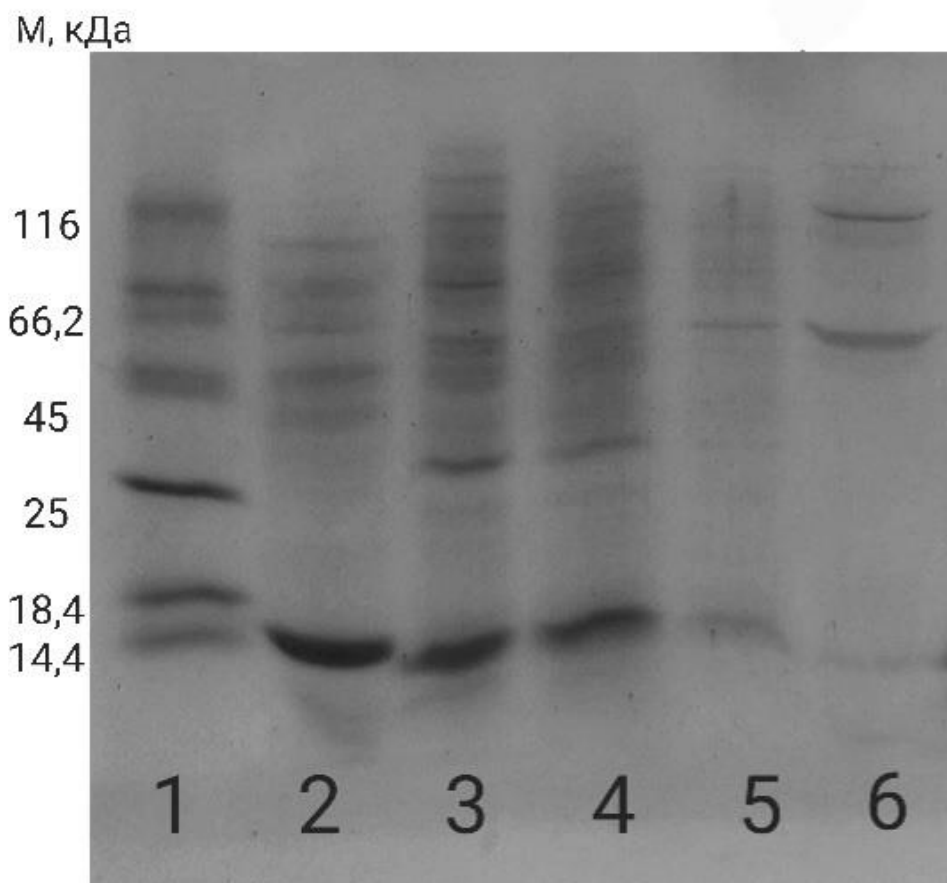


Рисунок 1 – Электрофореграмма

1 – белковый маркер; 2 – препарат фага MS2, 3 – лизат клеток *E. coli*; 4 – вирусоподобные частицы, очищенные методом высаливания; 5 – вирусоподобные частицы, очищенные методом осаждения органическими растворителями; 6 – вирусоподобные частицы, очищенные методом разделения в двухфазных системах.

Анализ полученных результатов показал, что метод высаливания 50% сульфатом аммония не позволил очистить вирусоподобные частицы от белков клеточного лизата (рис. 1, дорожка 4). Использование метода осаждения этанолом хотя и позволило очистить вирусоподобные частицы от большинства клеточных белков, но выход продукта был низким (рис. 1, дорожка 5). Метод разделения в двухфазных системах позволил очистить и сконцентрировать вирусоподобные частицы, при этом выход продукта был значительно выше, чем при использовании метода осаждения этанолом (рис. 1, дорожка 6).

Таблица 3

Результаты осаждения фага MS2 в двухфазной системе

Анализируемый раствор	Концентрация ПЭГ-6000			
	10%	20%	30%	40%
Титр бактериофага MS2, БОЕ/мл				
Супернатант	–	$4,50 \times 10^6$	$0,80 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$
Преципитат	$0,40 \times 10^8$	$5,48 \times 10^9$	$4,12 \times 10^9$	$4,00 \times 10^9$

**Выводы.** Установлено, что среди представленных методов очистки осаждение полиэтиленгликолем (ПЭГ) является менее токсичным и недорогим методом, который потенциально может быть использован для осаждения и очистки вирусоподобных частиц бактериофага MS2.

### Библиографический список

1. Fu Y, Li J. A novel delivery platform based on Bacteriophage MS2 virus-like particles. *Virus Res.* 2016 Jan 4;211:9-16. doi: 10.1016/j.virusres.2015.08.022.
2. González-Mora A, Hernández-Pérez J, Iqbal HMN, Rito-Palomares M, Benavides J. Bacteriophage-Based Vaccines: A Potent Approach for Antigen Delivery. *Vaccines (Basel).* 2020 Sep 4;8(3):504. doi: 10.3390/vaccines8030504.
3. Hanke M, Hansen N, Chen R, Grundmeier G, Fahmy K, Keller A. Salting-Out of DNA Origami Nanostructures by Ammonium Sulfate. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 4;23(5):2817. doi: 10.3390/ijms23052817.
4. Hashemi K, Ghahramani Seno MM, Ahmadian MR, Malaekheh-Nikouei B, Bassami MR, Dehghani H, Afkhami-Goli A. Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus like particles. *Sci Rep.* 2021 Oct 6;11(1):19851. doi: 10.1038/s41598-021-98706-1.
5. Патент № 2743796 С1 Российская Федерация, МПК А23С 1/06, А23Л 3/00, F25С 1/12. Криоконцентратор пищевых жидких сред карусельного типа : № 2020100760 : заявл. 09.01.2020 : опубл. 26.02.2021 / И. А. Короткий, И. Б. Плотников, Л. В. Плотникова [и др.] ; заявитель Федеральное государственное

бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кемеровский государственный университет"

## DEVELOPMENT OF METHODS FOR CONCENTRATION AND PURIFICATION OF MS2 BACTERIOPHAGE TO CREATE A VACCINE

*Kornilova Alyona Andreevna, student, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), e-mail: [shashkova1804@gmail.com](mailto:shashkova1804@gmail.com)*  
*Mashentseva Natalia Gennadievna, Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of Biotechnology and Technology of Bioorganic Synthesis Products, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), e-mail: [MashencevaNG@mgupp.ru](mailto:MashencevaNG@mgupp.ru)*

Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH),  
Moscow, Russia, e-mail: [mgupp@mgupp.ru](mailto:mgupp@mgupp.ru)

**Abstract:** *One of the promising directions for the creation of effective and cheap recombinant vaccines is the use of a development platform based on the RNA-containing bacteriophage MS2. In the course of the work, three methods of precipitation of the bacteriophage MS2 were compared and the possibility of using these methods to purify virus-like particles created on the basis of this phage was evaluated.*

**Keywords:** *concentration, purification, bacteriophage MS2, phage, vaccine, salting, precipitation, virus-like particles.*

---

УДК 636.2.034:005.52:005.33(470.32)

## ПРИМЕНЕНИЕ SWOT-АНАЛИЗА В СОВРЕМЕННЫХ АСПЕКТАХ ПРОИЗВОДСТВА МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

*Кубасов Иван Алексеевич, студент направления Технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», e-mail: [rbf25983@gmail.com](mailto:rbf25983@gmail.com)*

*Научный руководитель – Устинова Юлия Владиславовна, канд. техн. наук, доцент кафедры технологии хранения и переработки продуктов животноводства, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», e-mail: [yul48888048@yandex.ru](mailto:yul48888048@yandex.ru)*

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Россия, Москва, e-mail : [rector@rgau-msha.ru](mailto:rector@rgau-msha.ru)