

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ ИНОКУЛЯТА КУЛЬТУР *BACILLUS PUMILUS* B-13250, *B. TOYONENSIS* B-13249 ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ УСТАНОВКАХ

И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

Введение

Цикл развития бактериальной культуры начинается с помещения инокулята в благоприятную среду для ее роста. Засев осуществляется таким образом, чтобы количество посевного материала обеспечивало бы начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой (Хамагаева, Тумурова, 2007). Как правило, внесение небольшого количества инокулята в большой объем питательной среды может привести к диффузии из клеток витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов (Блажевич, 2004). Задачей биотехнологических исследований в этом направлении является понимание оптимальной дозы для развития культуры в условиях ферментера при глубинном культивировании целевых продуктов.

В связи с этим, цель нашего исследования – определение оптимального количества необходимой дозы инокулята для роста и размножения бактерий *B. pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249, перспективных для дальнейшего включения в состав пробиотических биопрепаратов.

Материалы и методы

Объектами исследования явились два ризосферных штамма споровых микроорганизмов: *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 из коллекции ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

Используемые в работе среды описаны в нашей работе ранее (Малкова и др., 2021). Питательные среды и реактивы: L-среда для приготовления на ней посевного материала; среда Эндо – для проверки наличия в пробах бактерий группы кишечной палочки; меласно-кукурузная ферментативная питательная среда – для культивирования микробов в биореакторах; криопротекторная (защитная) среда – для защиты бацилл при заморозке.

Подбор дозы инокулята для промышленного культивирования бактерий проводили на лабораторных ферментационных установках вместимостью 15 и 250 литров. Каждая ферментационная установка оснащена механическим перемешивающим устройством с регулируемым числом оборотов, системами автоматической терморегуляции и pH-статирования. Были исследованы разные варианты дозы инокулята: 1 %, 5,5 %, 10 %.

В данной работе задействовано оборудование: Шейкер-инкубатор («Innova 44», США), ферментер 15 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург, Россия), с загруженной питательной средой 10 л, ферментер 250 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург, Россия), наполнением 180 л ферментационной среды. Управление процессом компьютеризовано либо производится непосредственно на пульте управления (АСУ – Автоматическая система управления). Оба, задействованных в исследовании аппарата, показаны на рисунке 1.

Полученные результаты выражали через среднее значение (M) со стандартным отклонением (m).

Результаты и обсуждения

В результате проведения ряда циклов культивирования *B. pumilus* с долей посевного материала в 10 % от объема ферментера (10 л среды в ферментере общим объемом 15 л), выяснено, что данная доза инокулята успешно справляется со своей задачей: титр живых бактерий после цикла ферментации (24 ч) был $3,83(\pm 0,29) \times 10^{11}$ КОЕ/мл, а КОЕ/г сухого концентрата достигает значения $1,31(\pm 0,11) \times 10^{12}$. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Целью дальнейших исследований было определение оптимальной, для промышленного культивирования, доли посевного материала, а также понимание последствий понижения дозы инокулята при производстве пробиотика, включающего исследуемые штаммы.

Таблица 1 Показатели ферментации *B. pumilus* при доли посевного материала в 10 % ($M \pm m$).

Время взятия пробы	Показатели			
	pH	Визуальная оценка при микроскопии	Оптическая плотность	Количество КОЕ/г в высушенном концентрате
Среда до посева	6,80(± 0) статировано	Отсутствие МКБ	0,420($\pm 0,034$)	
2 ч	6,83($\pm 0,03$)	Одиночные палочки, мелкие	0,968($\pm 0,324$)	
4 ч	7,15($\pm 0,23$)	Палочки стали толще, их больше	1,756($\pm 0,091$)	
6 ч	7,82($\pm 0,02$)	Много клеток	1,847($\pm 0,017$)	
24 ч	7,92($\pm 0,03$)	Споры, редко палочки с экдоспорами	2,227($\pm 0,152$)	1,31($\pm 0,11$) $\times 10^{12}$

Результаты, представленные на рисунке 2, свидетельствуют, что доля даже в 1 % посевного материала для исследуемого оригинального штамма достаточна для проведения производственного цикла работ. Данный факт предоставляет нам экономически выгодные условия для дальнейшего включения в состав готового продукта *B. pumilus* B-13249, а также повышение эффективности при производстве готового продукта.

На рисунке 2А, показано количество КОЕ в зависимости от посевной дозы в аппарате, а 2В – количество биомассы, полученной при разных посевных дозах. Выявлено, что при культивировании штамма *B. pumilus* при увеличении доли посевного материала с 1 % до 10 % значение КОЕ/г на момент окончания ферментации меняется в пределах 1–2 порядков, но при любых вариантах достигает приемлемой для нас производственной степени 11. При этом доза инокулята в 5,5 % дает максимальное количество КОЕ/г – $4,44(\pm 0,52) \times 10^{12}$, повышение до 10 % влияния не оказало значительного повышения КОЕ/г, даже обнаружилось небольшое снижение, в пределах 1 порядка – $1,31(\pm 0,11) \times 10^{12}$. Полученные данные говорят о том, что клетки исследуемого ризосферного штамма, попав в богатую питательными веществами среду, начинают размножаться с максимальной скоростью, не взирая на количество инокулята, а также объема в 1 % достаточно для активизации необходимых ферментных систем. Однако, при высокой концентрации бактериальных клеток в среде при засеве, может наступить конкуренция за питательные субстраты, как можно наблюдать при варианте с 10 % посевной дозы. Растущие клетки не получают полноценного обеспечения своей жизнедеятельности и, поэтому, конечный титр биомассы будет не оптимальным.

Выявлено, что вариации с дозой инокулята незначительно повлияли на накопление биомассы исследуемого штамма. При дозе инокулята в 1 %, биомассы было меньше с одной ферментации, в среднем на 150 г. ($1331(\pm 123)$ г), что с экономической точки зрения, более выгодно, исходя из количества проводимых ферментаций (на одну меньше), соответственно, уменьшенные траты на дополнительные среды, электричество, трудозатраты, количество анализов на наличие контаминантной микрофлоры и общее сокращение времени производственного цикла, как минимум на 1 сутки (из расчета дополнительной 24 часовой ферментации в инокуляционном аппарате).

Аналогичные результаты получены при исследовании штамма *B. toyonensis*. На рисунке 3А, показано количество КОЕ в зависимости от посевной дозы в аппарате, 3В – количество биомассы, полученной при разных посевных дозах. Выявлено, что при культивировании *B. toyonensis* при увеличении доли посевного материала с 1 до 10 % значение КОЕ/г на момент окончания ферментации меняется в пределах 1–2 порядков, но при каждом из вариантов достигает 11 степени. Доза инокулята в 5,5 % также дает максимальное количество КОЕ/г – $1,51(\pm 0,38) \times 10^{12}$, повышение до 10 % дозы – влияния не оказало, даже количество КОЕ/г упало на 1 порядок – $3,32(\pm 0,41) \times 10^{11}$. Полученные данные говорят о том, что клетки данного штамма, также при попадании в богатую питательную среду, сразу имеют максимальную скорость размножения, незначительно реагируя на повышение дозы посевного материала, также выявлено, что объема маточной культуры в 1 % достаточно для активизации необходимых ферментных систем (полученный титр – $1,42(\pm 0,22) \times 10^{11}$).



Рисунок 1. Производственная площадка ИЦ «Промбиотех»: А – 250 литровый ферментер; В – 15 литровый ферментер

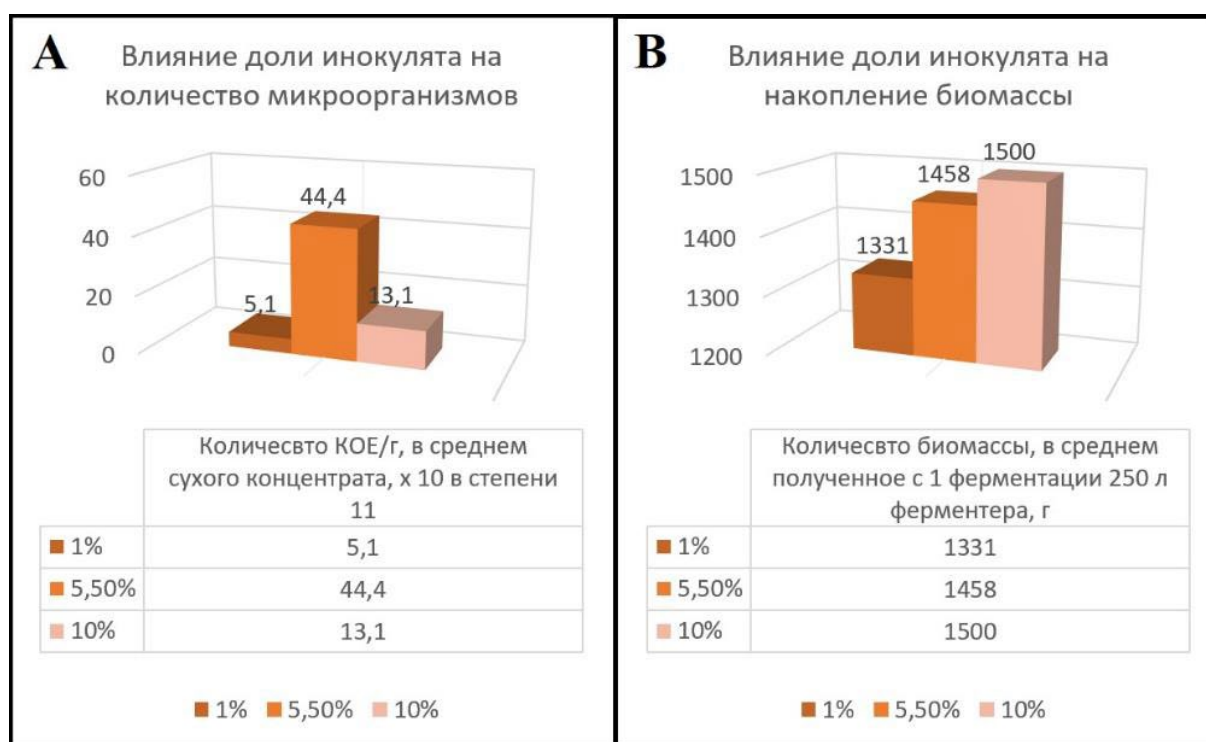


Рисунок 2. Влияние доли инокулята на количество КОЕ/г и накопление биомассы за суточный цикл ферментации *B. pumilus*: А – количество микроорганизмов; В – накопление биомассы

Подобная ситуация при культивировании данной культуры, как и штамма *B. pumilus*, в предыдущем исследовании: при высокой доле посевной культуры (10 %), видимо, наступает конкуренция за питательные субстраты, клетки не получают полноценного обеспечения питанием, вследствие чего, конечный титр биомассы ($3,32(\pm 0,41) \times 10^{11}$) ниже иных вариантов при доле 5,5 % ($1,51(\pm 0,38) \times 10^{12}$).

Полученная биомасса *B. toyonensis*, во всех вариантах культивирования была не ниже 1300 г., при использовании доли посевного в 10 % немного больше – около 1800(±72) г. При дозе инокулята в 1 % биомассы было меньше с одной ферментации, в среднем на 100 г. (1441(±95) г), что все равно, более выгодно, исключая дополнительную ферментацию в биореакторе-инокуляторе и все аспекты, входящие в работы и расходы на проведение данного дополнительного культивирования.

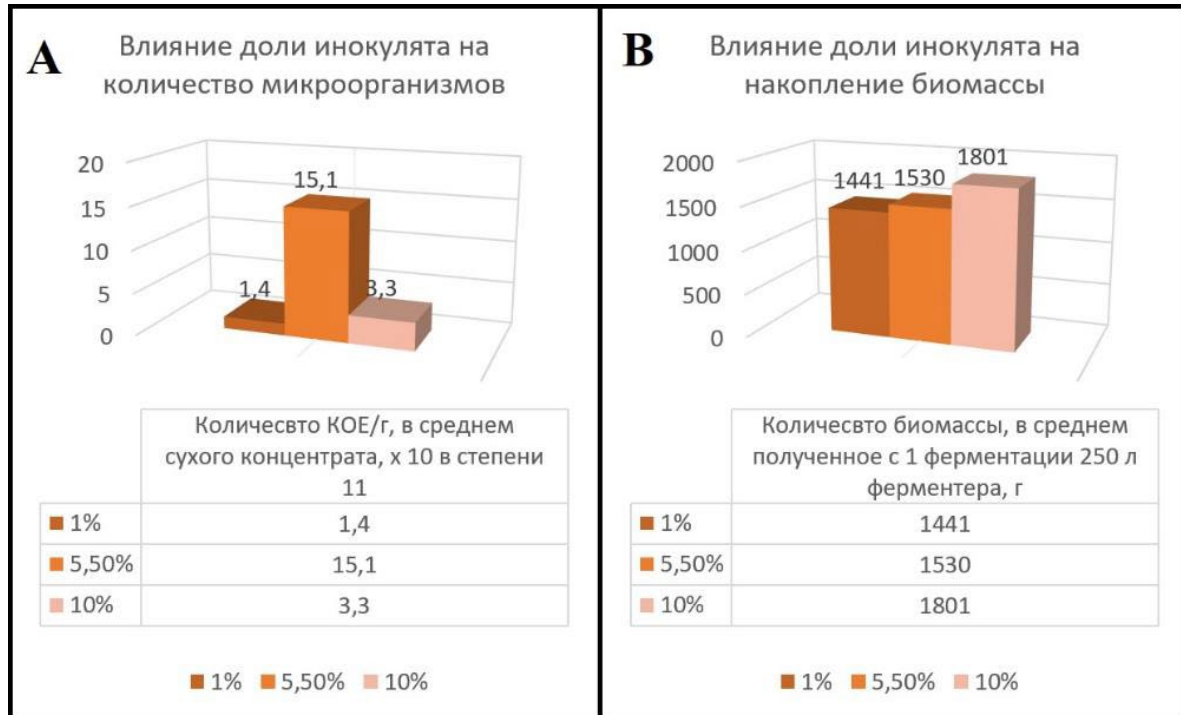


Рисунок 3. Влияние доли инокулята на количество КОЕ/г и накопление биомассы за суточный цикл ферментации *B. toyonensis*: А – количество микроорганизмов; Б – накопление биомассы

Выводы

1. Для наращивания биомассы *B. pumilus* B-13250 наиболее оптимальной дозой инокулята является 5,5 %, но для оптимизации технологических процессов, не теряя в качестве продукта, достаточно 1 %.
2. Для наращивания биомассы *B. toyonensis* B-13249 наиболее оптимальной дозой инокулята является также 5,5 %, но для оптимизации технологических процессов, не теряя в качестве продукта, достаточно 1 %.
3. Обильное накопление биомассы обоих штаммов происходило во всех вариантах проведенных ферментационных циклов, при разной доле посевного материала (1 %, 5,5 %, 10 %.) разница масс сухих концентратов находится в пределах 150 г., следовательно, экономически выгоднее и эффективнее использовать инокулят долей 1 %.

Литература

1. Блажевич О.В. Культивирование клеток: Курс лекций – Мн. – 2004. – 78 с.
2. Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021; 11(3):393–402. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>.
3. Хамагаева И.С., Тумурова С.М. Способ получения бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий. Патент РФ, № 2309982, 2007.