

УДК 57.083.132

UDC 57.083.132

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
ОПТИМИЗАЦИИ НЕКОТОРЫХ УСЛОВИЙ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PSEUDOMONAS SP114***

**INCREASING THE EFFICIENCY OF
OBTAINING A BIOLOGICAL PRODUCT
BASED ON OPTIMIZATION OF CERTAIN
CULTIVATION CONDITIONS OF
*PSEUDOMONAS SP114***

Петенко Александр Иванович
д.с.-х.н., профессор

Petenko Alexander Ivanovich
Dr.Sci.Agr., professor

Гнеуш Анна Николаевна
аспирант

Gneush Anna Nikolaevna
postgraduate student

Дмитриев Владимир Игоревич
*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

Dmitriev Vladimir Igorevich
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Представлены материалы по изучению
питательных сред и подбору режимов
культивирования

The article presents the materials of the study of
nutrient medium and selection modes of cultivations

Ключевые слова: РЕЖИМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ,
Pseudomonassp 114 , ФЕРМЕНТАЦИОННЫЙ
КОМПЛЕКС

Keywords: CULTIVATING ENVIRONMENT,
Pseudomonassp 114, POLYSACCHARIDES,
BATCH FERMENTATION

Получение высококачественных биопрепаратов напрямую зависит от организации процесса культивирования микроорганизмов, а при его оптимизации, в первую очередь от состава культуральной среды. Процесс ферментации, в свою очередь, является основным по биотехнологическим параметрам фактором оказывающим влияние на качество и эффективность биопрепарата.

Задачами настоящего исследования является:

- Подбор условий ферментации, обеспечивающих оптимизацию получения культуральной жидкости обладающей протеолитической активностью (высоким содержанием комплекса кислых протеаз);
- Удешевление питательной среды для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*;
- Изучение динамики потребления основных источников углерода, азота, протеолитических ферментов при выращивании *Pseudomonas sp114*.

Объектом исследования является культура *Pseudomonassp 114*, депонированная во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ) под № В-5060. Культура представляет собой подвижные мелкие палочки $0,5-1,0 \times 1,5-5,0$ мкм расположенные по одиночке, парами, очень редко в виде цепочки по 3-4 клетки, Грамм-положительные, спор и капсул не образует, пределы роста $+10^{\circ}\text{C} - +35^{\circ}\text{C}$. Гидролизует желатин, не гидролизует крахмал. В качестве источника углерода использует глюкозу, трегалозу, кетоглюконат, мезо-инозит, L-валин, L-аргинин, L-арабинозу, сахарозу, сорбит, пропионат, не использует бутират. Обладает аргининдегидролазной и лецитиназной активностью, способна к денитрификации нитрата и выступает в качестве антагониста широкого спектра фитопатогенных грибов. Исследуемая культура изображена на рисунке 1.

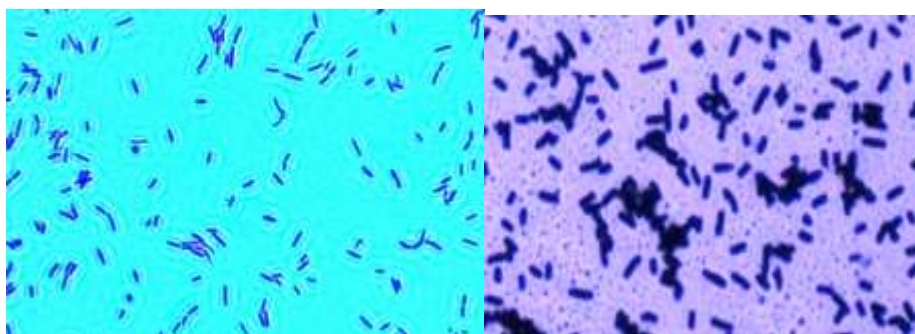


Рисунок 1 – Культура *Pseudomonassp 114*

Культура *Pseudomonassp 114* выступает как активный продуцент высокоактивного протеолитического комплекса, не является патогенной, вирулентной, относится к сапрофитам (микроорганизмам живущих в естественных, природных условиях и принимающим участие в разложении органических остатков).

На первом этапе наших исследований произведен подбор и анализ состава питательных сред для культивирования *Pseudomonasp 114*. в колбах объемом 250 мл на орбитальном термостатируемом шейкере таких как: LB, Кинг В, глюкозо-пептонная среда (среда Голубева), меласно-автолизатная (МАС) питательная среда.

Отмечено, что незначительные изменения состава среды меняют не только уровни накопления гидролитических ферментов, но и соотношение протеаз и амилаз на разных стадиях развития культуры [5].

Поскольку синтез некоторых ферментов, в частности протеазы, а также многих вторичных метаболитов подвержен азотной репрессии, продукция этих соединений может быть увеличена в результате замены аммония в питательной среде на менее эффективные источники азота.

Часто в биопрепаративных формах протеаз присутствует целый комплекс ферментов с различными свойствами и одновременно комплексы ферментов с близкими физико-химическими и каталитическими свойствами (изоферменты). Изоферменты идентичны по своему каталитическому действию, но различаются биофизическими константам. Биосинтез ферментов микроорганизмами тесным образом связан с основными условиями, влияющими на рост и развитие культур, и в первую очередь с составом питательной среды. Источники азота и углерода в питательной среде оказывают влияние, как на конструктивный обмен культур, так и на синтез ферментов. Относительно влияния различных источников азотистого питания в среде на рост микроорганизмов и образование протеолитических ферментов имеются различные мнения. Одни авторы считают, что белки являются единственным благоприятным источником азота для лучшего роста микроорганизмов и синтеза ферментов, другие же утверждают, что в

качестве лучшего источника азота необходимо использовать сочетание минерального и белкового субстратов и, наконец, ряд авторов полагают, что только минеральные соединения могут быть единственным источником азота [4].

Следующим этапом наших исследований являлся подбор питательной среды для культивирования *Pseudomonassp 114* с целью её удешевления и как следствие снижение себестоимости конечного продукта.

Известные питательные среды LB и Кинг В, являющиеся основными для культивирования бактерий рода *Pseudomonas.*, имеют такой недостаток как высокая стоимость, из-за дорогостоящего пептона входящего в состав основных сред. Использование на первом этапе глюкозопептонной среды (ГПС) было обусловлено универсальностью этой среды и хорошим ростом бактерий *Pseudomonassp. 114*. Достигнутый титр клеток *Pseudomonassp.* при выращивании на этой среде на качалочных колбах составлял 10^7 - 10^8 КОЕ.

При промышленном производстве биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas*, предназначенных для использования в микробиологическом производстве, высокая стоимость питательной среды неизбежно приведет к удорожанию целевого продукта.

Поставленная техническая задача удешевления стоимости питательной среды и увеличения выхода биомассы решается использованием меласно-автолизатной (МАС) питательной среды в которой в качестве углеродного субстрата входит кормовая меласса, являющаяся отходом свекло-сахарного производства и содержащая до 45% сахарозы при низкой стоимости, что наглядно продемонстрировано в таблице 1. В дальнейшем, эта

среда использовалась как основа производственной среды для получения культуры *Pseudomonassp.*

Таблице 1 - Сравнительная оценка стоимости компонентов исследуемых сред

Наименование среды	Компоненты	Расход реактива в среде, кг/л	Стоимость реактивов за 1 кг/руб	Стоимость на 1 литр среды.руб.
LB	Пептон (ферментативный)	0,010	2304,73	23,05
	Дрожжевой экстракт	0,05	2665,38	133,27
	NaCl	0,010	118,0	1,18
Итого			157,4	
Кинг В	Пептон	0,020	2304,73	46,09
	Глицерин	0,010	352,98	3,53
	K ₂ HPO ₄	0,0015	649,37	0,97
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0015	152,45	0,23
Итого			50,82	
Глюкозо-пептонная среда Голубева	Na ₂ HPO ₄	0,0032	262,99	0,84
	K ₂ HPO ₄	0,0003	649,37	1,95
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0005	152,45	0,08
	NaCl	0,0005	118,0	0,06
	Пептон (ферментативный)	0,002	2304,73	4,61
	Дрожжевой экстракт	0,0005	2665,38	1,33
	Глюкоза	0,025	262,45	6,56
Итого			15,43	
Меласно-автолизатная среда (МСА)	Меласса кормовая	0,045	4,0	0,18
	K ₂ HPO ₄	0,002	649,37	1,30
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0015	152,45	0,23
	Дрожжевой автолизат	0,000268	11594,39	3,11
Итого			4,82	

Культивирование маточной культуры на орбитальной качалке проводилось в следующем режиме:

Аэрация – 200 об/мин, температура культивирования – 30°C, время культивирования – 24 часа до достижения титра клеток – 10⁶ КОЕ.

Затем в питательную среду (МАС) засеивали 40 мл маточной культуры бактерий *Pseudomonassp 114*. Ферментацию осуществляли в течение 48 часов при 30°C при постоянной аэрации. Титр клеток в культуральной жидкости в конце ферментации составлял 10^8 КОЕ.

Подготовленная таким образом культура *Pseudomonassp.* являлась маточной для засева ферментер Ока-01-05К «Каскад» предназначенного для реализации способа культивирования микроорганизмов, основанного на циклическом перемещении фиксированного объема культивационной среды через каскад ферментеров, в каждом из которых находятся микроорганизмы или клетки, имеющие заданную и периодически восстанавливаемую стадию роста.

Ферментер обеспечивает ускоренное проведение поисковых научно-исследовательских и технологических работ, направленных на интенсификацию, в первую очередь непрерывных методов культивирования микроорганизмов, использование которых позволит значительно снизить стоимость получаемых продуктов.

Установка Ока-01-05К «Каскад» представленная на рисунке 2, является устройством лабораторного типа, обеспечивающим проведение исследовательских работ в области биотехнологии, культивационной гидродинамики, стерилизации ферментационного оборудования, жидких и газовых сред и интерактивного управления многостадийными процессами.

Комплекс представляет собой модульное биотехнологическое оборудование, позволяющее производить в периодическом и непрерывном режиме широкий спектр биотехнологических продуктов, причем переход с выпуска одного продукта к другому осуществляется по программе под управлением компьютера.

Модульное построение биотехнологических агрегатов и систем управления, а также их принцип действия, обеспечивают полную автоматизацию и интерактивный контроль многостадийных процессов.

Установка имеет набор методик и компьютерных программ, обеспечивающих режимы периодического и «каскадного» (отъемно-доливного, непрерывного) культивирования микроорганизмов.



Рисунок 2 - Ферментер Ока-01-05К «Каскад»

Для культуры *Pseudomonas sp.114* на меласно-автолизатной среде как оптимальными были подобраны следующие условия выращивания: температура культивирования 30-32°C; аэрация 1,0-1,5 л/л/мин, скорость вращения мешалки 150-200 об/мин; рН среды 6,8-7,2; подтитровка– 5% КОН, пеногаситель – адеканоль; время культивирования – 48-72 часа. Достигнутый титр клеток составлял 10^8 кл/мл.

Дальнейшие работы по подбору режима культивирования микроорганизмов *Pseudomonas sp. 114* проводили на ферментационном оборудовании ОКА-100 с объемом 100 л представленной на рисунке 3, предназначенном для реализации процессов культивирования микроорганизмов, биосинтеза, биокатализа и биотрансформации биологически активных веществ по энергосберегающей технологии с использованием в качестве продуцентов бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, микроводорослей и тканей.



Рисунок 3 – Ферментер ОКА-100

После отработки режимов культивирования на установке ОКА-100 по показателям аэрации, температурного режима, объема потока культуральной жидкости были установлены оптимальные величины этих показателей.

Для культуры *Pseudomonassp. 114* на меласно-автолизатной среде в ферментере ОКА-100 оптимальными условиями выращивания являлись: температура культивирования 30-32°C, аэрация 1,0-1,5 л/л/мин, скорость мешалки 150-200 об/мин, рН 6,8-7,2, подтитровка 5% КОН, пеногашение с помощью адеканоля, время культивирования – 8-72 часа. Достигнутый титр клеток составлял 10^8 КОЕ. Динамика роста культуры *Pseudomonassp. 114* при выращивании на в ферментёре ОКА МФ-100 на МАС представлена на рисунке 4.

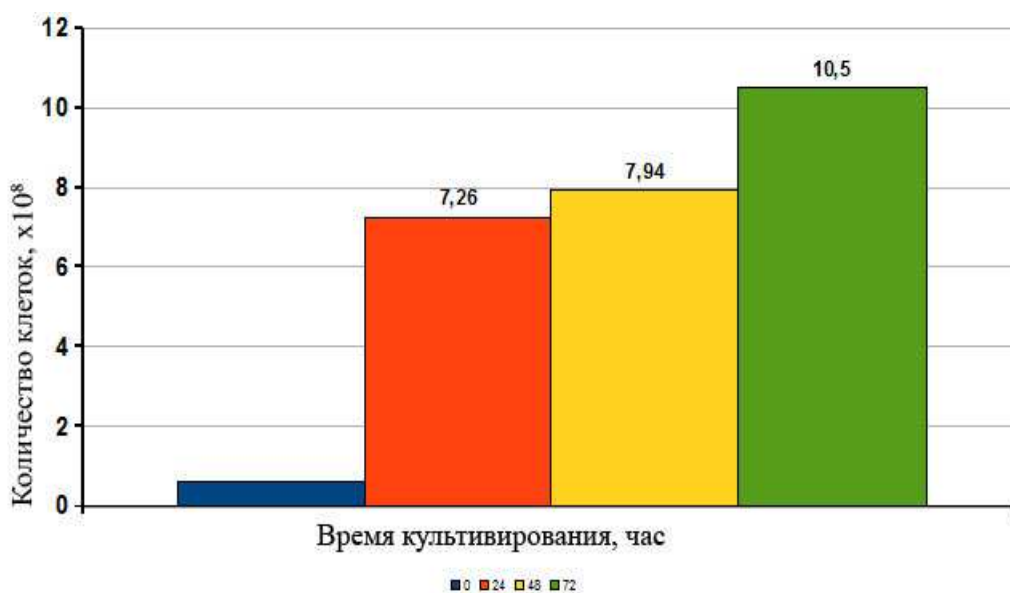


Рисунок 4 - Динамика роста культуры *Pseudomonasp. 114* при выращивании на ферментёре ОКА МФ-100 на МАС

При выращивании культуры *Pseudomonasp. 114* в ферментерах двух типов ОКА МФ-05 и ОКА МФ-100, отмечено, что результаты подбора режимов культивирования показали хорошую повторяемость, независимо от объема применяемого ферментера, что позволяет говорить о возможности дальнейшего масштабирования ферментационных процессов на установках большего объема (от 1000 л и более), что важно при получении этого компонента биопрепарата в промышленных условиях.

При культивировании *Pseudomonasp. 114* на среде с мелассой в качестве источника углерода отмечено, что 4% по редуцирующим веществам (Рв) давало эффект прироста биомассы в течение 72 часов и не приводило к переходу культуры в стационарную фазу роста.

Установлены их оптимальные значения, посевная доза – 10^6 кл/мл и насыщение среды кислородом – 70-90%.

Таким образом, выращивание маточных культур для дальнейшей разработки биопрепарата производили в колбах объемом 250 мл на глю-

козо-пептонной среде на ротационном шейкере при оптимальных температурах и аэрации для каждого вида.

Режим культивирования маточной культуры *Pseudomonassp.* 114 на орбитальной качалке:

- обороты качалки – 200 об/мин
- температура культивирования – 30°C
- время культивирования – 24 часа
- до достижения титра клеток – 10^6 кл/мл.

Засевная биомасса культуры составляет 1 % от рабочего объема ферментера.

Режим выращивания культуры *Pseudomonassp.* 114 в ферментере:

- температура культивирования – 30-32°C;
- аэрация 1,0-1,5 л/л/мин;
- обороты мешалки 150-200 об/мин;
- рН 6,8-7,2;
- подтитровка 5% КОН;
- пеногашение–адеканолю;
- время культивирования – 48-72 часа;

Достигнутый титр клеток составляет 10^9 кл/мл.

Действие препарата основано как на дальнейшем развитии культуры на объекте применения, так и на непосредственном действии КЖ с ферментами на побочные продукты перерабатывающих предприятий основными из которых являются отходы животноводства.

После получения в ферментере биомассы клеток с заданным титром производится асептическая расфасовка культуральной жидкости с клетками в подготовленные асептические емкости. До применения биопрепарата хранение производят при температуре – + 5°

Список литературы:

1. Роуз.Э. Химическая микробиология. – Изд. «Мир», М.1971, С.259-265. УДК 576.8
2. Перт.С.Дж Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – Изд. «Мир»,М. 1978, С.144-165, 249-258. УДК 576.8.093.3+578.085.23.
3. Методы практической биохимии. Под ред. Б.Уильямса и К.Уилсона. – Изд. «Мир», М. 1978, С. 18-30. УДК 541.1+577.1
4. Хусид С. Б. Биохимические аспекты консервирования витаминного растительного сырья минеральными и биологическими консервантами/С.Б. Хусид, А.И. Петенко. И.С. Жолобова// Научный журнал КубГАУ, № 96(02), 2014 г.
5. Кощаев А. Г. Кормовая добавка на основе ассоциативной микрофлоры: технология получения и использование / А. Г. Кощаев, А. И. Петенко // Биотехнология. – 2007. – № 2. – С. 57–62.
6. Кощаев А. Г. Кормовые добавки на основе живых культур микроорганизмов / Кощаев, А. Г., Петенко, А. И. // Птицеводство. – 2006. – № 11. – С. 43–45.
8. Матреничева В.В. Химико-ферментативная обработка пищевых волокон растительного сырья/Матреничева В.В., Иванова А.А., Волкова О.Б // Пищевая промышленность, 2004. №8. С 7-12.
9. Пат. 2437864, Российская Федерация, МПКС05F3/00, А01С3/00, С05F11/08.Способ микробиологической переработки птичьего помета/ В.И. Дмитриев, И.В.Мартынова. Л.И. Кочкина. Опубл. 27.12.2011. Бюл. № 7.
10. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология»/З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина и др.; Под ред. Н.С.Егорова. – М. Высш. шк. 1989. 688 с. ISBN 5-06-001482-7, ББК 28.4 П 81, УДК 663.18
11. Андреева А.П. Микробиологическая трансформация анабазина микроорганизмами родаPseudomonasspp. Вестник Новосибирского государственного университета. Биология, клиническая медицина. 2010. Т. 8. № 4. С. 150-154.
- 12.SiddiquiI.A.,NaasD.,HeebS. ExtracellularproteaseofPseudomonasfluorescensnaoabiocontrolfactorwithactivityagainststheroot-knotnematodeMeloidogyneincognita // Appl. Envitor. Microbiol. 2005. Vol. 71, № 9. P. 5646-5649.
13. Spiruchostatins a and b, novel gene expression-enhancingsubstances produced by Pseudomonas sp. Masuoka Y., Nagai A., Shinya K., Furihata K., Nagai K., Suzuki K.I., Hayakawa Y., Seto H. Tetrahedron Letters. 2001. T. 42. № 1. С. 41-44

References

1. Rouz.Je. Himicheskaja mikrobiologija. – Izd. «Mir», М.1971, S.259-265. UDK 576.8
2. Pert.S.Dzh Osnovy kul'tivirovanija mikroorganizmov i kletok. – Izd. «Mir»,М. 1978, S.144-165, 249-258. UDK 576.8.093.3+578.085.23.
3. Metody prakticheskoy biohimii. Pod red. B.Uil'jamsa i K.Uilsona. –Izd. «Mir», М. 1978, S. 18-30. UDK 541.1+577.1
4. Husid S. B. Biohimicheskie aspekty konservirovanija vitaminnogo rastitel'nogo syr'ja mineral'nymi i biologicheskimi konservantami/S.B. Husid, A.I. Petenko. I.S. Zholobova// Nauchnyj zhurnal KubGAU, № 96(02), 2014 g.
5. Koshhaev A. G. Kormovaja dobavka na osnove asociativnoj mikroflory: tehnologija poluchenija i ispol'zovanie / A. G. Koshhaev, A. I. Petenko // Biotehnologija. – 2007. – № 2. – S. 57–62.
6. Koshhaev A. G. Kormovye dobavki na osnove zhivyh kul'tur mikroorganizmov / Koshhaev, A. G., Petenko, A. I. // Pticevodstvo. – 2006. – № 11. – S. 43–45.

8. Matrenicheva V.V. Himiko-fermentativnaja obrabotka pishhevyh volokon rastitel'nogo syr'ja/Matrenicheva V.V., Ivanova A.A., Volkova O.B // Pishhevaja promyshlennost', 2004. №8. S 7-12.
9. Pat. 2437864, Rossijskaja Federacija, MPKC05F3/00, A01C3/00, C05F11/08.Sposob mikrobiologicheskoj pererabotki ptich'ego pometa/ V.I. Dmitriev, I.V.Martynova. L.I. Kochkina. Opubl. 27.12.2011. Bjul. № 7.
10. Promyshlennaja mikrobiologija: Ucheb. posobie dlja vuzov po spec. «Mikrobiologija» i «Biologija»/3. A. Arkad'eva, A. M. Bezborodov, I. N. Blohina i dr.; Pod red. N.S.Egorova. – M. Vyssh. shk. 1989. 688 s. ISBN 5-06-001482-7, BBK 28.4 P 81, UDK 663.18
11. Andreeva A.P. Mikrobiologicheskaja transformacija anabazina mikroorganizmami roda Pseudomonas sp. Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologija, klinicheskaja medicina. 2010. T. 8. № 4. S. 150-154.
12. Siddiqui I.A., Haas D., Heeb S. Extracellular protease of Pseudomonas fluorescens ssp. biocontrol factor with activity against the root-knot nematode Meloidogyne incognita // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71, № 9. P. 5646-5649.
13. Spiruchostatins a and b, novel gene expression-enhancing substances produced by Pseudomonas sp. Masuoka Y., Nagai A., Shinya K., Furihata K., Nagai K., Suzuki K.I., Hayakawa Y., Seto H. Tetrahedron Letters. 2001. T. 42. № 1. S. 41-44