

УДК 579.61**А.С. Абилхадиров**, магистр ветеринарии

ОО «BioMix» (г. Нур-Султан)

E-mail: good_alien@mail.ru

Г.К. Абитаева, PhD

РГП на ПХВ «Республиканская коллекция микроорганизмов» (г. Нур-Султан)

E-mail: gulyaim_as@mail.ru

А.Ж. Темирханов, кандидат сельскохозяйственных наук

ОО «BioMix» (г. Нур-Султан)

E-mail: rkm13@mail.ru

Р.Т. Доспаева, магистр биотехнологии

ОО «BioMix» (г. Нур-Султан)

E-mail: anuarraihan@mail.ru

К.Д. Закарья, доктор биологических наук

ОО «BioMix» (г. Нур-Султан)

E-mail: rkm_kz@mail.ru

Оптимизация питательной среды для культивирования молочнокислой бактерии *Lactobacillus casei* VM-4/17 B-RKM 0746 в биореакторе

Аннотация. В данной статье приведен сравнительный анализ питательных сред для культивирования молочнокислой бактерии *Lactobacillus casei* VM-4/17 B-RKM 0746 в биореакторе. Главными критериями для выявления эффективности питательной среды являются накопление наибольшей биомассы клеток молочнокислых бактерий и количество компонентов питательной среды по отношению к полученной биомассе.

Ключевые слова: культивирование, питательная среда, биомасса, состав, биореактор, фаза.

Для культивирования молочнокислых бактерий (МКБ) существуют множество питательных сред, состоящих из дорогостоящих и зачастую труднодоступных субстратов. Литературных данных по оптимизации питательных сред для наработки биомассы МКБ имеется в достаточном количестве, однако вопрос по поиску и оптимизации питательных сред остается актуальным в настоящее время [1].

МКБ широко применяются в производстве пищевых продуктов, присутствуют во всех молочных продуктах, таких как йогурт, сыр, молоко. МКБ используют в производстве биологически активных добавок к пище, для восстановления естественной микрофлоры ЖКТ. Еще одно немаловажное применение МКБ – очистка воды от органических загрязнителей.

Представленная в статье культура *Lactobacillus casei* VM-4/17 B-RKM 0746 входит в состав биопрепарата по очистке сточных и канализационных вод. Он содержит активные микроорганизмы, направленные на создание естественного и устойчивого биоценоза в водоеме. При внесении биопрепарата в загрязненные водоемы запускается активный процесс самоочистки воды, снижается содержание сероводорода и патогенных микроорганизмов. И для промышленного производства биопрепарата в будущем вопрос об оптимизации питательной среды является актуальным.

Для наработки биомассы использовали биореактор, Infors HT «Labfors 5» (Switzerland). Для наблюдения за фазами роста по оптической плотности использовали спектрофотометр, Agilent Technologis «Cary 60» (USA). Для осаждения полученных культур использовали центрифугу Thermo Scientific «Sorval RC 6+» (Germany). Для взвешивания полученной биомассы использовали весы Adventurer «Ohaus», USA.

Были испытаны две питательные среды: MPC бульон (PKM - 7), MRS milk (на основе сыворотки молока). В качестве стандартного образца для сравнения использовали питательную среду MRS (HiMedia). Состав сред указан в таблице 1.

В качестве культуры для посева использована *Lactobacillus casei* VM-4/17 B-RKM 0746, культура была взята из депозитария центрального музея микроорганизмов РГП на ПХВ «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК. Культура хранилась при минус -20°C , в криосреде.

Культура *Lactobacillus casei* VM-4/17 B-RKM 0746 перед основным посевом была активирована согласно следующему протоколу.

Таблица 1 – Состав питательных сред, использованных в испытаниях

Ингредиенты	MRS (HiMedia) г/л	MPC бульон (PKM - 7) г/л	MRS milk г/л
Дрожжевой экстракт	5,00	0,5	
Пептон	10,0	10,00	
Глюкоза	20,00	20,00	15,00
Аммоний лимоннокислый	2,00	2,00	
Натрий уксуснокислый	5,00	5,00	
Калий фосфорнокислый 2-х зам		2,00	
Сульфат марганца	0,05	0,05	
Сульфат магния	0,10	0,20	
Твин 80	1,00	1,00	
Лактоза		1,00	15,00
L-цистеин			0,03
Молочная сыворотка			800,00
Натрий фосфорнокислый	2,00		

Из криопробирки была взята аликвота объемом 100 мкл и внесена в питательную среду объемом 900 мкл, затем суспензия была помещена в термостат на 30 минут при температуре 37 °С. В дальнейшем из выше указанной пробирки была взята аликвота объемом 500 мкл и перенесена в пробирку с готовой средой объемом 4500 мкл. Полученная суспензия была помещена в термостат на 24 часа, при температуре 37 °С. Затем 2,5 мл культуральной среды перенесли в колбу с готовой средой объемом 25 мл, разбавленную смесь оставляли в термостате на 24 часа, при 37 °С. После этого весь объем был перенесен в биореактор, где уже была подготовлена среда объемом 2972,5 мл. Общий объем составил 3000 мл. Перед запуском биореактора была проведена калибровка рН датчика. Программа биореактора для всех трех питательных сред была однотипной (таблица 2).

Таблица 2 – Программа биореактора для культивирования МКБ.

рН	6.8
Скорость вращения мешалки	60 об. в минуту
Температура	37 °С
Объем среды	3000 мл
Объем внесенной культуры	30 мл
Уровень газонасыщения	1 мин ⁻¹ (1 литр воздуха в минуту)
рO ₂	20 % (процент растворенного кислорода)

Для поддержания постоянного значения рН использовались титровальные растворы. В качестве титровальных растворов были использованный 1М раствор лимонной кислоты, 1М раствор гидроксида натрия [2].

В процессе ферментации между определенными промежутками времени производился сбор аликвот культивируемой жидкости и измерение их абсорбции на спектрофотометре, измерения были проведены при длине волны 600 nm. Измерения проводились для вычисления фаз роста культуры и момента времени, когда культура истощит питательные субстраты и выйдет в фазу отмирания [2].

Перед каждым измерением спектрофотометр обнулялся по бланк образцу (среды без культуры клеток). По разнице бланка и образца была высчитана разница оптической плотности. В ходе работы была получена следующая картина роста.

Среда Himedia. Аликвоты были взяты в 0 время момент, когда биореактор набрал нужную для культивирования температуру 37 °С. Затем были взяты пробы на 120, 240, 300, 360, 420, 450, 480, 510, 540, 570, 600, 630, 660, 690-ых минутах. На каждый отрезок времени была взята аликвота в объеме 4 мл. Общее время составило, учитывая время фазы отмирания, 690 мин (рисунок 1).

Среда MPC-7. Аликвоты были взяты в 0 время, момент, когда биореактор набрал нужную для культивирования температуру 37 °С. Затем были взяты пробы на 120, 240, 300, 360, 420, 450, 480, 510, 540, 570, 600, 630, 660-ых минутах. На каждый отрезок времени была взята аликвота в объеме 4 мл. Общее время составило, учитывая время фазы отмирания, 660 мин (рисунок 2).

Согласно среде MRS milk, аликвоты были взяты в 0 время момент, когда биореактор набрал нужную для культивирования температуру 37 °С. Затем были взяты пробы на 120, 240, 300, 360, 420, 450, 480, 510, 540, 570, 600, 630-ых минутах. На каждый отрезок времени была взята аликвота в объеме 4 мл [3]. Общее время составило, учитывая время фазы отмирания, 630 мин (рисунок 3).

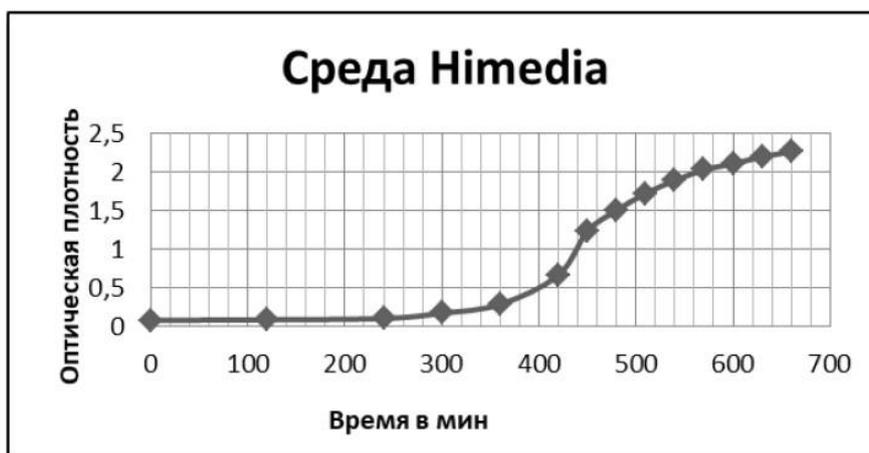


Рисунок 1 – Кривая роста в среде Himedia

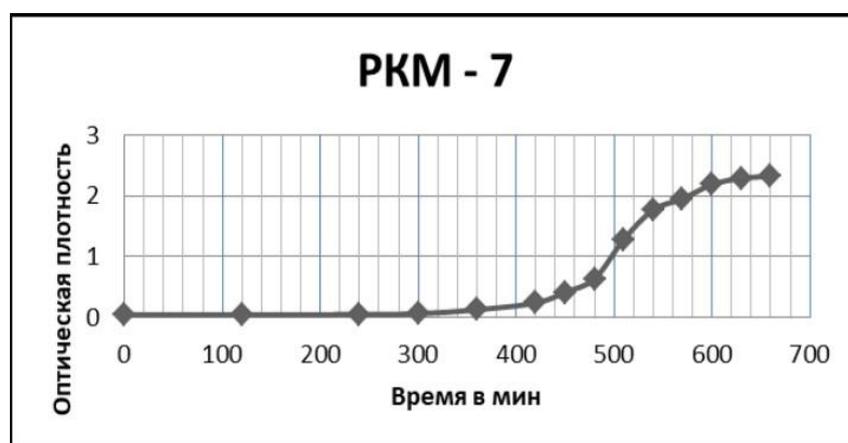


Рисунок 2 – Кривая роста в среде РКМ-7

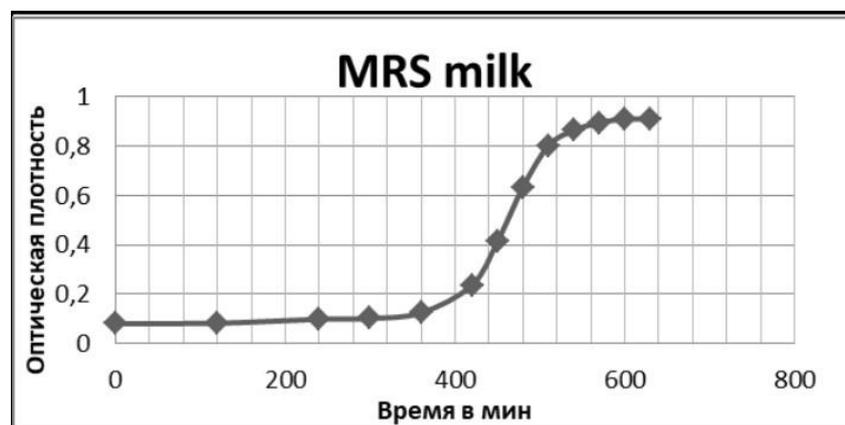


Рисунок 3 – Кривая роста в среде MRS milk

После окончания ферментации весь объем был собран в стерильные колбы. Далее было проведено отделение питательной среды от биомассы путем центрифугирования. Питательная среда удалялась после осаждения. По окончании осаждения всей биомассы для отчистки биомассы от солей, содержащихся в питательной среде, было проведено центрифугирование изотоническим раствором NaCl 0,9 %. После центрифугирования раствор NaCl 0,9 % был удален. Далее путем взвешивания была высчитана масса полученной биомассы.

Таблица – Данные взвешивания биомассы

Среда	Объем в мл (с вычетом объема взятого для спектрофотометрии)	Время культивирования (момент выхода в фазу отмирания)	Полученная масса, в гр.
Himedia	2940	690	15,54
MPC-бульон (PKM-7)	2944	660	25,75
MPC milk	2948	630	22,5

Из результатов исследования следует, что коммерческая среда Himedia требует большего времени культивирования по сравнению с MPC-бульон (PKM-7) и MPC milk. По полученной биомассе, в сравнении с конечным объемом среды (с вычетом объема взятого на спектрофотометрию), первой была отмечена среда «PKM-7», за ним следовала «MPC milk». Разница конечного объема среды отличается незначительно – на 4 мл.

Для культивирования МКБ в биореакторе при малом бюджете лучше использовать среду MPC milk, так как по времени культивирования и составу среды она подходит для более быстрого и экономичного набора биомассы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
- 2 Ленгелер Й., Древис Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты // Мир. – 2005. – С. 132-133. – Режим доступа: <https://rutracker.org/forum/>

REFERENCES

- 1 Netrusov A.I. Egorova M.A. Zakharchuk L.M. Praktikum po mikrobiologii. – M.: Izdatelskiy tsentr «Akademiya», 2005. – S 608.
- 2 Lengeler I. Drevis G. Shlegel G. Sovremennaya mikrobiologiya. Prokarioti // Mir. – 2005. – S. 132-133. – Rezim dostupa: <https://rutracker.org/forum/>

ТҮЙІН

А.С. Абилхадиров, ветеринария магистрі
ЖСШ «BioMix» (Нұр-Сұлтан қ.)
Г.К. Абитаева, PhD
ҚРБҒМ «Микрорганиздер Республикалық Коллекциясы»
ШЖҚ РМК (Нұр-Сұлтан қ.)
А.Ж. Темирханов, ауылишаруашылық ғылымдарының кандидаты
ЖСШ «BioMix» (Нұр-Сұлтан қ.)
Р.Т. Доспаева, биотехнология магистрі
ЖСШ «BioMix» (Нұр-Сұлтан қ.)
К.Д. Закарья, биология ғылымдарының докторы
ЖСШ «BioMix» (Нұр-Сұлтан қ.)

Биореакторда сүт қышқылды *Lactobacillus casei* bm-4/17 b-rkm 0746 бактериясын өсіру үшін қоректік ортаны оңтайландыру

Бұл түйінде сүт қышқылдары *Lactobacillus casei* BM-4/17 B-RKM 0746 биореактор арқылы өсіру үшін, қоректенетін ортанының салыстырмалы талдау жасалды. Қоректік заттардың тиімділігін анықтаудың негізгі критерийлері сүт қышқылды бактерия жасушаларының жоғары биомассасының жинақталуы және алынған биомассаға қатысты қоректік орта компоненттерінің саны болды.

Түйінді сөздер: өсіру, қоректік орта, биомасса, құрамы, биореактор, фаза.

RESUME

A.S. Abilhadirov, Master of of Veterinary Science

LLP «BioMix» (Nur-Sultan)

G.K. Abitayeva, PhD

The RSE «RCM» Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (Nur-Sultan)

A.J. Temirhanov, Candidate of Agricultural Science

LLP «BioMix» (Nur-Sultan)

R.T. Dospayeva, Master of Biotechnology

LLP «BioMix» (Nur-Sultan)

K.D. Zakarya, doctor of biological Sciences

LLP «BioMix» (Nur-Sultan)

Optimization of the nutrient medium for cultivation of the lactic acid bacteria lactobacillus casei bm-4/17 b-rkm 0746 in a bioreactor

This article presents a comparative analysis of nutrient media for the cultivation of lactic acid bacteria Lactobacillus casei BM-4/17 B-RKM 0746 in a bioreactor. The main criteria for identifying the effectiveness of the nutrient medium were the accumulation of the highest biomass of lactic acid bacteria cells and the amount of nutrient medium components in relation to the biomass obtained.

Key words: cultivation, nutrient medium, biomass, composition, bioreactor, phase.