

О.Г. Упхоева, преподаватель, e-mail: upkhoevaolya@mail.ru

Т.Е. Данилова, канд. техн. наук

В.Ж. Цыренов, д-р биол. наук, проф.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ

УДК579.872.1:579.24

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РОСТА
PROPIONIBACTERIUM SCHERMANII
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ**

В статье приведены результаты влияния порфирина крови и состава питательной среды на изменение кинетических параметров роста пропионовокислых бактерий.

Ключевые слова: порфирин, удельная скорость роста, пропионовокислые бактерии.

O.G. Upkhoeva, teacher

T.E. Danilova, Cand. Sc. Engineering

V.Zh. Tsyrenov, D. Sc. Biology, Prof.

**DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS
OF *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII* GROWTH DEPENDING
ON NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION**

The article presents the results of blood porphyrin and composition of the nutrient medium influence on a change of the kinetic parameters of propionic acid bacteria growth.

Key words: porphyrin, specific growth rate, specific speed of division, propionate.

Потребности промышленности в витамине В₁₂ удовлетворяются за счет микробиологического синтеза [1]. Витамин В₁₂ активно продуцируется при глубинном культивировании *Propionibacterium shermanii* [5]. В отличие от ряда других витаминов витамин В₁₂ прочно связан с протоплазмой и при жизни клеток в среду не выделяется. Поэтому необходимо, чтобы численность бактерий в 1 мл среды достигала более высокого уровня. В процессе ферментации в условиях закрытой системы возрастает негативное влияние лимитирующих факторов [3]. Известно, что в густых микробных популяциях быстрее потребляются питательные вещества и накапливаются продукты обмена, которые неблагоприятно влияют на скорость роста. Таким образом, чем выше численность клеток, тем ниже скорость роста, и наоборот. Величина удельной скорости роста, определяющая кинетические характеристики культуры, в значительной степени зависит от субстрата. Обычно витамин В₁₂ синтезируют на среде, содержащей кукурузный экстракт, глюкозу, соли кобальта, сульфат аммония, предшественник нуклеотидной части витамина – 5,6-диметилбензимидазол (ДМБ). Предполагается, что при наличии в среде предшественников витамина В₁₂ увеличиваются рост бактерий и продуктивность по данному витамину. Предшественником корриноидной части витамина В₁₂ может служить порфирин крови [4]. Использование предшественника тетрапиррольного цикла требует внесения определенных изменений в существующую биотехнологию. Наиболее существенной частью в этом алгоритме являются выбор и оптимизация состава питательной среды. Как известно, компоненты питательных сред определяют рост и строение микробных клеток. Выбирая питательные компоненты, можно создать условия для протекания определенных метаболических процессов с повышенной скоростью или подавить другую метаболическую деятельность. В самом приближенном виде состав питательных сред выявляется на основании химического состава клетки. При этом, однако, не учитываются состав и количество выделенных метаболитов. В связи с чем состав питательной сре-

ды *Propionibacterium shermanii* устанавливали экспериментально с учетом выхода витамина В₁₂ и знаний физиологии продуцента.

Цель исследования: изучить влияние порфирина крови крупного рогатого скота и состава питательной среды на скорость роста *Propionibacterium shermanii*.

Объекты и методы исследования

Работа проводилась с культурой *Propionibacterium shermanii* sp, полученной из Всесоюзного научно-исследовательского института молочной промышленности (г. Москва). Опыты ставились на питательных средах, состав и обозначение которых представлены в таблице 1.

Таблица 1

Состав питательных сред

Компоненты среды, г/л	Питательные среды		
	№1	№2	№3
Кукурузный экстракт	20	-	-
Глюкоза	20	-	-
Лактат кальция	-	10	20
Дрожжевой экстракт	-	10	10
Гидролизат казеина	-	10	10
K ₂ HPO ₄	2,0	2,5	2,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02	0,02	0,02
H ₂ O, мл	1000	1000	1000

В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру *P. Shermanii*, выращенную на среде №1 [7]. Пропионовокислые бактерии выращивали при 30 °С периодическим глубинным способом в стационарных условиях в течение 120 ч. Содержание в культуральной жидкости витамина В₁₂ определяли спектрофотометрическим методом на 96 ч культивирования после предварительной дезинтеграции клеток и осаждения белков [6]. Среды стерилизовали при 0,5 атм. в течение 20 мин.

Порфирин крови добавляли в количествах 5, 10, 25, мг/л, который был выделен из крови убойных животных, предварительно обработанной биотехнологическим способом, разработанным на кафедре «Биотехнология» ВСГУТУ [2]. Совмещали процессы введения порфирина в питательные среды и поддержания в ней благоприятного уровня рН (6,8-7,0). Вместо раствора соды добавляли щелочной раствор порфирина.

Метод определения живых клеток бактерий основан на способности факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотной питательной среде при 37±1 °С в течение 48 ч. Разведения культуральной жидкости засеивали в количестве 0,5 мл на чашки Петри и сверху заливали расплавленной и охлажденной до 40 °С питательной средой [7]. Биомассу определяли методом высушивания после ее отделения от культуральной жидкости [6].

Результаты исследования

Проведены исследования влияния порфирина на процесс накопления *Propionibacterium shermanii* витамина В₁₂. Установлено, что при культивировании *P. Shermanii* на питательной среде состава № 3 продуктивность по витамину В₁₂ выше, чем на среде состава № 1 (рис. 1).

Исследовали влияние порфирина на показатели роста культуры *P. shermanii*.

Определены значения концентраций биомассы бактерий – абсолютно сухая биомасса (АСБ) в зависимости от содержания источников углерода и порфирина крови. В качестве источника углерода для биосинтеза пропионовокислых бактерий (ПКБ) использованы глюкоза и лактат Са (табл. 1). Результаты исследований биомассы бактерий, полученных на контрольных средах, содержащих в качестве источника углерода лактат кальция и глюкозу, представлены на рисунке 2.

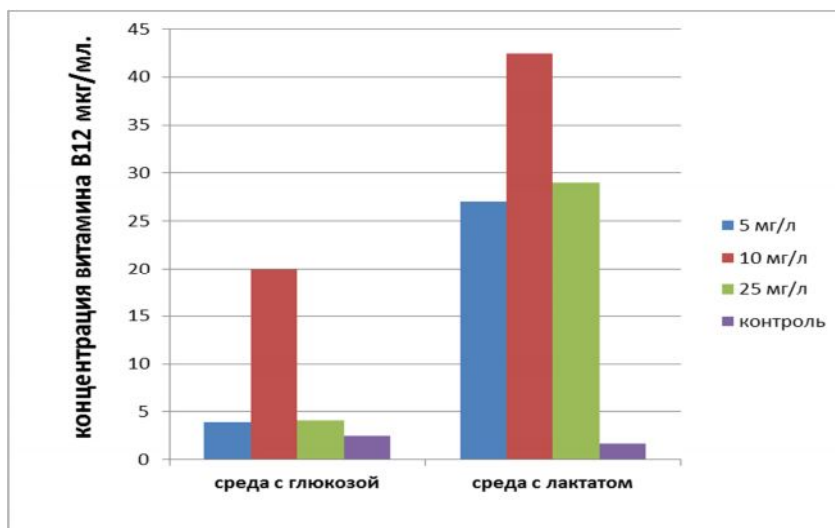


Рис. 1. Выход витамина В₁₂ в зависимости от концентрации порфирина крови в питательных средах

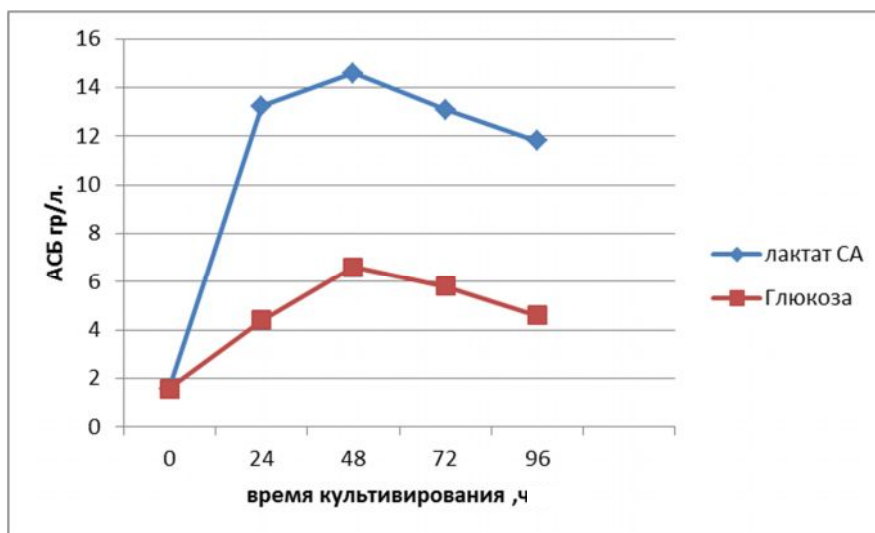


Рис. 2. Динамика изменения биомассы *P. shermanii* при культивировании на питательных средах № 1, 2

Из рисунка 2 видно, что выход биомассы *P. shermanii* значительно выше на среде с лактатом Са, чем на среде с глюкозой. Использование в качестве источника углерода лактата создает селективные условия для роста пропионовокислых бактерий.

Изменение количества биомассы *P. shermanii* в зависимости от количества вносимого в питательную среду порфирина крови представлено на рисунке 3. Оценивая влияние порфирина крови на рост биомассы пропионовокислых бактерий, можно констатировать, что увеличение концентрации биомассы получено в экспоненциальной фазе роста при введении 10 мг порфирина на среде № 3.

Прирост биомассы *P. shermanii* за 72 ч культивирования на средах № 2 и № 3, содержащих 5, 10, 25 мг/л порфирина крови демонстрируют данные в таблице 2. Видно, что активный рост культуры *P. shermanii* в присутствии порфирина крови определяется не только его концентрацией, но и количеством лактата в среде. Так, содержание лактата в количестве 10 г/л не обеспечивает уровень прироста биомассы *P. shermanii*, который был получен при культивировании на средах с 20 г/л лактата и разных концентрациях порфирина.

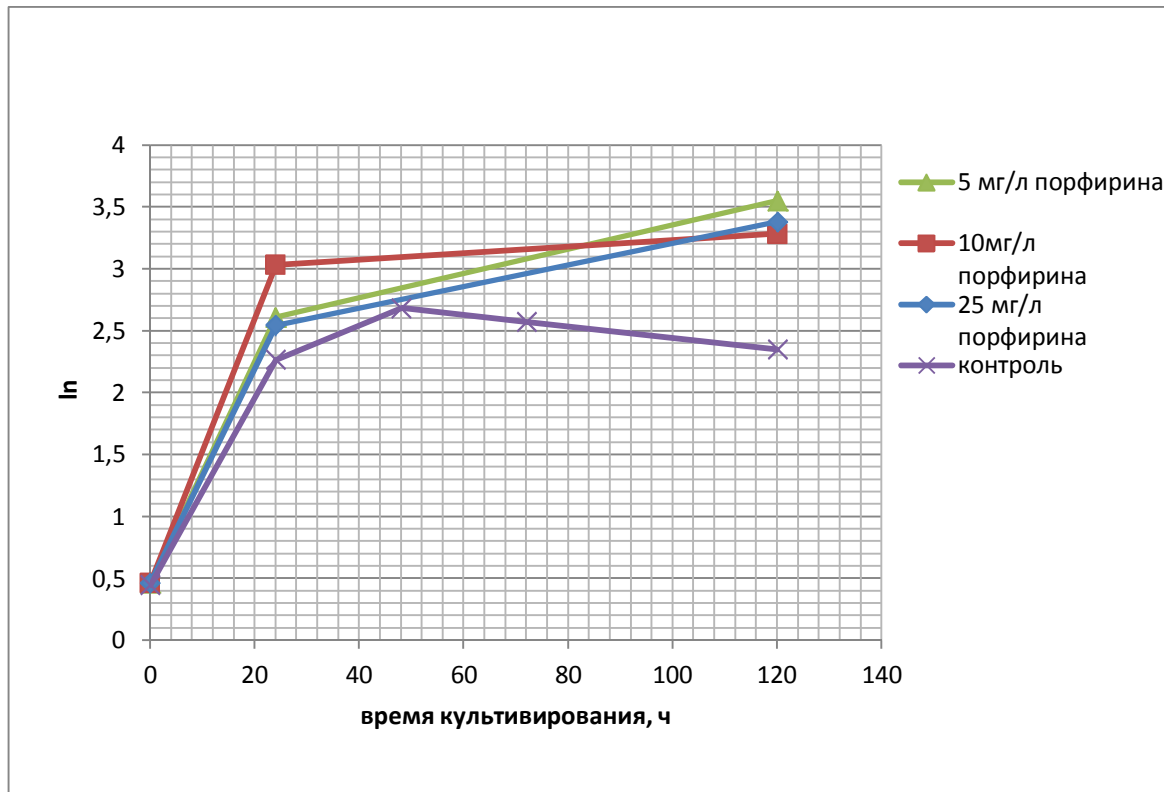


Рис. 3. Кинетика биомассы *P. shermanii* на среде с лактатом Са в концентрации 20 г/л

Таблица 2

Удельная скорость роста культуры *P. shermanii*

Концентрация порфирина, мг/л	Удельная скорость роста $\mu \text{ ч}^{-1}$	
	Среда №2	Среда №3
5	0,0065	0,091
10	0,008	0,11
25	0,0115	0,083
контроль	0,0125	0,076

Кинетика роста клеток *P. shermanii* в зависимости от источника углерода показана на рисунке 4. В данном случае обнаружена обратная зависимость; количество клеток пропионовокислых бактерий выше при культивировании на среде с глюкозой, чем на лактатной среде.

Для определения удельной скорости деления культуры при различных концентрациях порфирина крови строили график в системе координат $\{\ln N; t\}$. Из графиков зависимости числа клеток от времени, представленных на рисунке 5, видно, что культивирование на средах, содержащих 5, 10 мг/л порфирина, позволяет получить количество клеток культуры пропионовокислых бактерий практически одинаковое с таковым на контрольной среде № 1

При этом отсутствует лаг-фаза, переход к стационару наблюдается через 48 ч, стадия отмирания клеток имеет место через 80 ч культивирования.

Из графиков зависимости числа клеток от времени, представленных на рисунке 6, видно, что культивирование на средах сочетающих 5-10 мг/л порфирина и 10 г/л лактата, эффективность прироста выше, чем на контрольной среде № 2.

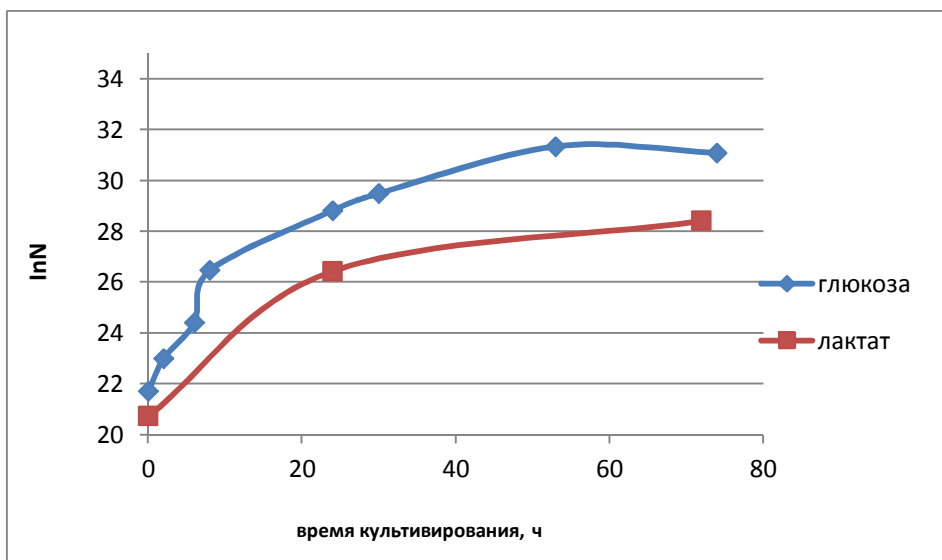


Рис. 4. Кинетика роста *P. shermanii* на средах № 1, 2

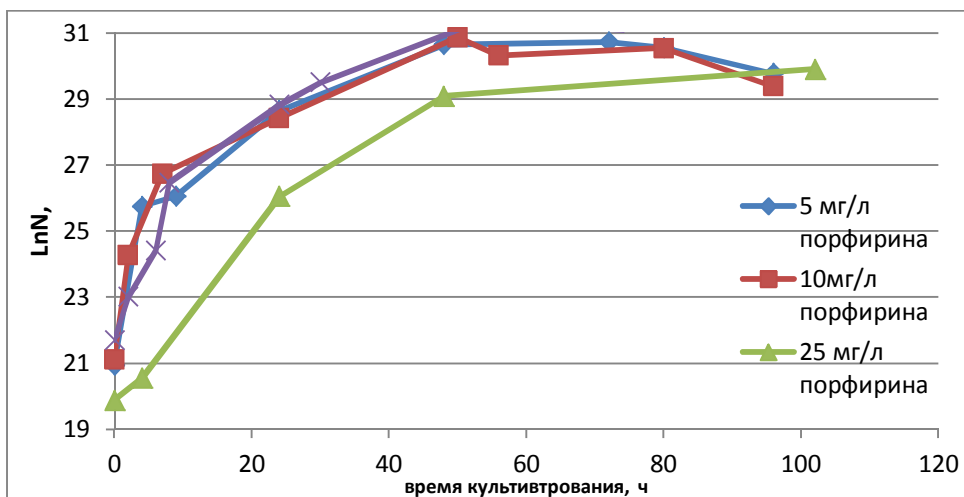


Рис. 5. Влияние концентрации порфирина крови на кинетику роста *P. shermanii* на среде № 1

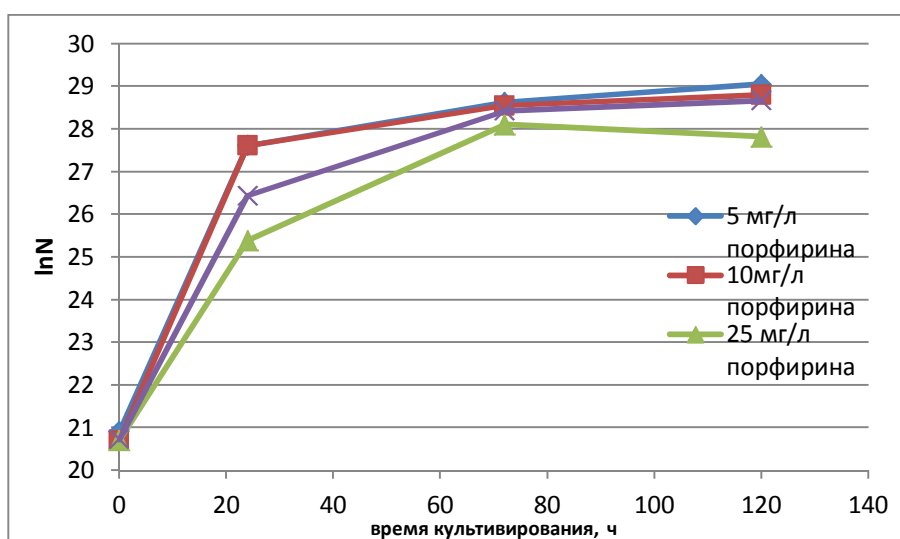


Рис. 6. Влияние концентрации порфирина крови на кинетику роста *P. shermanii* на среде № 2

Результаты исследований влияния разных концентраций порфирина на удельную скорость деления можно оценить с помощью данных, приведенных в таблице 3.

Удельная скорость роста *P. shermanii*

Концентрация порфирина мг/л	Удельная скорость деления ν ч ⁻¹	
	среда №1	среда №2
5	0,1107	0,0949
10	0,1109	0,0962
25	0,0986	0,0961
контроль	0,1228	0,0976

Введение порфирина крови в состав питательной среды № 1 снижает скорость размножения клеток *P. shermanii* на 10-20%, а в питательной среде № 2 – на 1-3%, в зависимости от концентрации тетрапиррола.

Выводы

1. Показано стимулирующее действие лактата Са на накопление биомассы культуры *P. shermanii* sp.
2. Показано ингибирующее действие лактата Са на рост *P. shermanii* sp.
3. Установлено, что введение порфирина крови в концентрациях 5, 10, 25 мг/л увеличивает рост *P. shermanii* sp на питательных средах с лактатом.
4. Установлено, что введение порфирина в концентрациях 5-10 мг/л обеспечивает удельную скорость роста клеток равную таковой на среде с глюкозой и более высокую, чем на среде с лактатом.
5. Показано, что введение 25 мг/л порфирина крови в питательные среды уменьшает скорость роста клеток *P. shermanii* sp.

Библиография

1. Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Егоров Н.С. и др. Промышленная микробиология: учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология», «Биология» / под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. школа, 1989. – 688 с.
2. Бубеев А.Т. Влияние молочной сыворотки на свертывающую систему крови убойных животных и разработка биотехнологического способа получения протопорфирина: автореф. ... канд. биол. наук. – Улан-Удэ, 2006.
3. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
4. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 288 с.
5. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. – СПб.: Наука, 1995. – 601 с.
6. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.
7. Шутова В.В., Ивинкина Т.И., Фадеева И.В. и др. Использование послеспиртовой барды для культивирования молочнокислых и пропионовокислых бактерий // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 6. – С. 68–74.

Bibliography

1. Arkadieva Z.A., Bezborodov A.M., Egorov N.S. et al. Industrial microbiology. Textbook for high schools for «Microbiology», «Biology» / Ed. by N.S. Egorov. – M.: Vyschaya shkola, 1989. – 688 p.
2. Bubeev A.T. Effect of whey on blood coagulation of slaughtered animals and the development of a biotechnological process for protoporphyrin production: Abstract of the Diss. ... Cand. Sc. Biology. – Ulan-Ude, 2006.
3. Varfolomeev S.D., Gurevich K.G. Biokinetika. – M.: FAIR-PRESS, 1999. – 720 p.
4. Vorobyova L.I. Propionic acid bacteria. – M.: Moscow State University Publishing house, 1995. – 288 p.
5. Elinov N.P. Basics of biotechnology. – SPb.: Nauka, 1995. – 601 p.
6. Netrusov A.I. Workshop on Microbiology: Textbook for university students / Ed. by A.I. Netrusov. – M.: Publishing Center «Academia», 2005. – 608 p.
7. Shutova V.V., Ivinkina T.I., Fadeeva I.V. et al. Use of distillers grains for cultivation of lactic and propionic acid bacteria // Biotechnology. – 2010. – Vol. 3, N 6. – P. 68–74.