

ARTICLE

УДК 57.043:579.62:579.66:663.15:663.18

СТИМУЛЯЦИЯ УЛЬТРАЗВУКОМ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ И ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Д.А. Дурникин, М.М. Силантьева, О.В. Ерещенко
Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, пр. Ленина, 61
Email: Durnikin@list.ru, msilan@mail.ru, olga4ka_asu@mail.ru

Показана возможность интенсификации процесса накопления биомассы бактерий - продуцентов молочной и пропионовой кислот *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* и *Propionibacterium acidipropionici* в условиях глубинного культивирования путем обработки посевного материала ультразвуком частотой 880 кГц с плотностью энергии 0.1-0.7 Вт/см³. Применение данной технологии обеспечивает прирост концентрации клеток вышеуказанных культур микроорганизмов в культуральной жидкости в 28.6, 9 и 16.7 раз, соответственно, по сравнению с контролем.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии, ферментация, стимуляция, ультразвук

ULTRASOUND-ENHANCED CELL PRODUCTION OF LACTIC AND PROPIONIC ACID BACTERIA UNDER SUBMERGED CULTIVATION FOR INDUSTRIAL PURPOSES

D.A. Durnikin, M.M. Silantyeva, O.V. Ereshchenko
Altai State University, Email: Durnikin@list.ru, msilan@mail.ru, olga4ka_asu@mail.ru

Lactic and propionic bacteria are actively used as feed and food biopreservatives. The industrial production of these bacteria is carried out using known standard biotechnological approaches and equipment. However, the modern requirements to the volumes of their production require the development of new technologies providing the more intensive growth of bacterial biomass. One of the possible ways to do it is the use of nonspecific stimulators of chemical or physical origin. The stimulating effect of ultrasound on live systems attracts attention of many researchers. Depending on the sonication parameters and conditions, the impact of ultrasound on cell cultures can either stimulate or suppress their life processes. The possibility of the ultrasound stimulation of the biomass accumulation process has been studied for submerged bacterial cultures of *Lactococcus lactis* VPKM B-2092, *Lactobacillus plantarum* VPKM B-4173, and *Propionibacterium acidipropionici* VPKM B-2092. The inoculum with cell concentration of $1 \cdot 10^8$ mL⁻¹ was sonicated at 880 kHz and energy density varied within 0.1-0.7 W/cm³ using a specially designed cuvette, through which the cell suspension was introduced into a fermenter at a rate of 10 mL/s that provided the total sonication time equal to 100-120 seconds. As a signal source, a standard therapeutical ultrasound apparatus UZT-1.01F equipped with a sweep generator was used.

For all three cultures, the ultrasound stimulation resulted in a significant increase in the optical density of culture broth comparing to the control and the corresponding increase of the cell concentration. The optimum sonication energy density for the *Lactococcus lactis* VPKM B-2092, *Lactobacillus plantarum* VPKM B-4173, and *Propionibacterium acidipropionici* VPKM B-2092 was equal to 0.5, 0.3-0.5 и 0.3 W/cm³, respectively. Comparing to the control, the cell count of these strains in the culture broth increased in 28.6, 9, and 16.7 times, respectively.

Thus, the ultrasound stimulation of inoculum provides a significant increase in the biomass of cells producing lactic and propionic acid that, in turn, increases the economic efficiency of their industrial use. Since the mechanisms of such stimulating action of ultrasound are well-studied, and the exploitation of ultrasound generators is simple and cheap, the further development of the ultrasound stimulation approach seems to be very promising for the industrial microbiology.

Keywords: lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, fermentation, stimulation, ultrasound

Citation:

D.A. Durnikin, M.M. Silantyeva, O.V. Ereshchenko (2016). Ultrasound-enhanced cell production of lactic and propionic acid bacteria under submerged cultivation for industrial purposes. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6 (2), 287–293.

Поступило в редакцию / Submitted: 10.05.2016

Принято к публикации / Accepted: 06.07.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201659>

© Durnikin, Silantyeva, Ereshchenko, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. License

ВВЕДЕНИЕ

Среди множества разнообразных кормовых консервантов особое место занимают биоконсерванты на основе молочнокислых и пропионовокислых бактерий, производство которых достаточно успешно осуществляется с использованием комплекса стандартных биотехнологических узлов и приемов. Однако современные требования к объемам промышленного производства биоконсервантов требуют разработки технологий интенсификации их роста и размножения.

Ускорение роста и развития микроорганизмов возможно, например, путем введения специфических биостимуляторов - ростовых факторов, предшественников синтеза макромолекул и вторичных метаболитов, некоторых соединений, способных стимулировать синтетическую и репродуктивную активность клеток (Шигаева, 2002).

Некоторые физические факторы, и в частности, ультразвук, также способны оказывать неспецифическое стимулирующее воздействие как на одноклеточные, так и на многоклеточные живые организмы (Акопян, Ершов, 2016).

К неспецифическим стимуляторам относятся незнакомые организму воздействия, на которые у организма нет стандартной программы реагирования и которые поэтому воспринимаются как сигнал возможного неблагоприятного развития событий. В качестве ответной реакции биологическая система, активизируя защитные механизмы, стремится повысить свою продуктивность (в общем смысле этого слова), поскольку повышение продуктивности является универсальным способом компенсации возможных потерь в будущем (Акопян и др., 1988).

Очевидно, что ни природа, ни выраженность воздействия неспецифического стимулятора не будут оказывать существенного влияния на морфологию организма, если стимулирующее воздействие имеет характер сигнала и не вызывает структурных нарушений в системе. Например, ультразвук низкой интенсивности интенсифицирует трансмембранный перенос, вызывая изменения в структуре клеточных мембран и увеличивая их проницаемость, а также снижая диффузионные ограничения за счет акустических микропотоков вблизи клеточных поверхностей. Возникающее при этом нарушение состава внутриклеточной среды и микроокружения клетки не может не отразиться на скорости биохимических реакций с участием ферментов, весьма чувствительных к содержанию в среде тех или иных ионов, продуктов ферментативных реакций и некоторых других веществ.

В общем и целом, механизм действия ультразвука на клетки можно представить в виде следующих последовательных событий:

→ проявление физико-химических ультразвуковых эффектов в среде (микропотоки с высокими градиентами скоростей, тепловые градиенты у мембран, снижение мембранных потенциалов, образование продуктов сонохимических реакций),

→ нарушение микроокружения клеточных мембран (снижение градиентов концентраций различных веществ возле мембран, обратимая десорбция молекул с их поверхности, изменение мембранного потенциала, обратимое уменьшение вязкости внутриклеточной среды),

→ изменение проницаемости клеточных мембран (снижение диффузионных ограничений, изменение эффективности активного транспорта, нарушение целостности мембран),

→ изменение состава внутри- и внеклеточной среды,

→ изменение скоростей ферментативных реакций в клетке (небольшая активация и преимущественное подавление ферментативных реакций в клетках, вследствие изменения оптимальных для функционирования ферментов концентраций ионов натрия и калия),

→ развитие репаративных реакций в клетке, связанных с новыми синтезами (синтез РНК и новых ферментов, продуцируемых клеткой для компенсации возникшего недостатка в продуктах ферментативных реакций).

Из анализа этой весьма упрощенной схемы следует, что специфичным проявлением действия ультразвука на биологические системы является изменение микроокружения клеточных мембран, приводящее к нарушению процессов переноса веществ через мембраны. Дальнейшая цепочка событий может быть запущена и другими физико-химическими факторами, приводящими к увеличению проницаемости клеточных мембран (Акопян, Ершов, 2016).

Стимулирующее воздействие ультразвука на живые системы давно привлекает внимание многих исследователей (Chisti, 2003; Tabatabaie and Mortazavi, 2010; Lye et al., 2012).

Ультразвуковое воздействие на клетки в суспензии или в культуре, в зависимости от параметров ультразвука и условий облучения, может обусловить как стимуляцию, так и подавление процессов их жизнедеятельности.

Известны, в частности, попытки стимулировать рост и развитие микроорганизмов низкочастотным ультразвуком (20–30 кГц), воздействие которым приводит к разрушению некоторого количества клеток и обогащению среды содержимым разрушенных клеток (Lye et al., 2012; Oleshkevich, 2015). При этом часть клеток выводится из процесса ферментации, снижая ее эффективность, а часть оставшихся целыми клеток развивается более интенсивно. Две эти противоположные тенденции приводят к тому, что результат стимуляции низкочастотным ультразвуком оказывается труднопредсказуемым.

В относительно мягких условиях обработки ультразвуком высокой частоты (1–5 МГц, 0.2–1 Вт/см²), наблюдаются процессы стимулирования синтеза соединительного белка в клетках культуры фибробластов (Oleshkevich, 2015), интерферона в лейкоцитах (Олешкевич и др., 2015), синтеза механозависимого фактора роста в культуре клеток *Saccharomyces cerevisiae* YBS618/pKX-MGF (Олешкевич и др., 2015) и т.д. Увеличение интенсивности ультразвукового воздействия приводит к угнетению биохимических процессов в клетках и уменьшению количества клеток в культуре. Следует отметить, что на сегодняшний день выраженная физическая интенсификация процессов культивирования микроорганизмов в суспензиях без использования ультразвуковых технологий является трудно осуществимой (Акопян, Ершов, 2016).

Целью настоящего исследования являлась оценка возможности применения ультразвуковой стимуляции роста и развития молочнокислых и пропионовокислых бактерий при глубинном культивировании в промышленных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на бактериях *Lactococcus lactis* ВКПМ В-2092, *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-2092, культивируемых в ферментере емкостью 1 м³ производства ООО «ПромТрубМонтаж» (Россия). Состав посевных сред и сред для глубинного культивирования приведен в табл. 1. Режимы культивирования трех использованных в исследовании штаммов микроорганизмов представлены в табл. 2.

Таблица 1. Состав посевных сред и сред для глубинного культивирования культур микроорганизмов

Компонент среды	<i>Lactococcus lactis</i> и <i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Propionibacterium acidipropionici</i>
	Посевная среда (г/л)	Среда для глубинного культивирования, г/л	Посевная среда и среда для глубинного культивирования, г/л
Лактоза	20.0	30.0	0.5
Кукурузный экстракт	10.0	25.0	20.0
Дрожжевой экстракт	5.0	5.0	-
Меласса	-	-	10.0
Пептон мясной	5.0	5.0	-
Сульфат магния	2.0	2.0	-
Сульфат аммония	-	-	0.5
Мел	5.0	5.0	-
Лапрол	2.2	2.2	2.2
Гидроортофосфат калия	2.0	2.0	-
Вода	До 1 л	До 1 л	До 1 л
рН	7.1	7.1	7.3

Толщина стенки кюветы, через которую осуществляется воздействие, была кратна четверти длины волны сигнала несущей частоты, что существенно снижает потери энергии при прохождении ультразвука через нее. В качестве источника основного несущего ультразвукового сигнала был использован стандартный терапевтический аппарат УЗТ-1.01Ф (ОАО «ЭМА», Россия). Модуляцию сигнала осуществляли при помощи свип-генератора АНР-1012 (НПО «Промавтоматика», Россия). Конструкция проточной кюветы обеспечивала стимулирующее воздействие ультразвука на посевной материал при сохранении стерильности посевного материала и среды культивирования (Рис. 1).

Посевной материал с концентрацией клеток приблизительно $1 \cdot 10^8$ мл⁻¹, подвергали действию ультразвука с плотностью мощности 0.1–0.7 Вт/см³ в процессе перекачивания клеточной суспензии в ферментер со скоростью 10 мл/с, что обеспечивало ультразвуковое воздействие на весь посевной

материал в течение 100-120 с. При введении в ферментер обработанный посевной материал подвергали разбавлению, в результате чего исходный титр клеток в ферментационной среде составлял от $0.6 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^7$ мл⁻¹.

Таблица 2. Режимы глубинного культивирования использованных в исследовании культур микроорганизмов

Параметры культивирования	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>
Температура ферментации, °С	29	37	29
рН в начале ферментации	6.8-7.0	6.8-7.0	6.8-7.0
рН первые 10-12 часов	6.0 - 6.2	6.0 - 6.2	6.0 - 6.2
рН в конце процесса, ≥	4.5	4.5	4.7
Аэрация	без доступа воздуха	без доступа воздуха	без доступа воздуха
Перемешивание	постоянное	постоянное	постоянное
Избыточное давление, МПа	0.05-0.07	0.05-0.07	0.05-0.07
Время ферментации, часов	16-18	20-22	18-20

После стимуляции ультразвуком глубинное культивирование микроорганизмов проводили в одинаковых, приближающихся к оптимальным, условиях. Перед началом и после завершения культивирования отбирали пробы культуральной жидкости и определяли их оптическую плотность при $\lambda = 540$ нм в кювете с толщиной измеряемого слоя 5 мм, после чего оценивали содержание клеток по предварительно построенным калибровочным кривым. Эксперимент проводили как минимум в трех повторностях. Анализ и статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007.

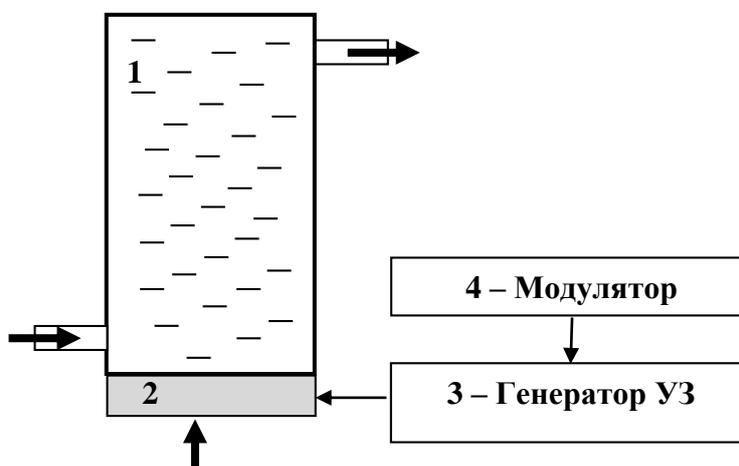


Рис. 1. Устройство для стимуляции ультразвуком клеток в суспензии. 1 - кювета для обработки ультразвуком засеваемого материала, 2 – излучатель ультразвука, 3 - генератор ультразвуковых колебаний, 4 – модулятор ультразвуковых колебаний. Стрелками показаны ввод для суспензии стимулируемых клеток и выход кюветы, соединенный с ферментером.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные приведены на рисунках 2-4. Для всех трех культур микроорганизмов в результате ультразвуковой стимуляции было отмечено существенное увеличение оптической плотности культуральной жидкости по сравнению с контролем и пропорциональное возрастание концентрации клеток в ней.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка клеток посевного материала ультразвуком с частотой 880 кГц в интервале исследованной плотности мощности излучения обеспечивает прирост накопления клеток всех трех исследованных бактериальных культур, причем оптимальная плотность мощности ультразвукового воздействия для *Lactococcus lactis* ВКПМ В-2092, *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-2092 составляет 0,5, 0,3-0,5 и 0,3 Вт/см³, соответственно; при этом количество клеток в культуральной жидкости по сравнению с контролем для указанных штаммов увеличивается в 28,6, 9,0 и 16,7 раз соответственно.

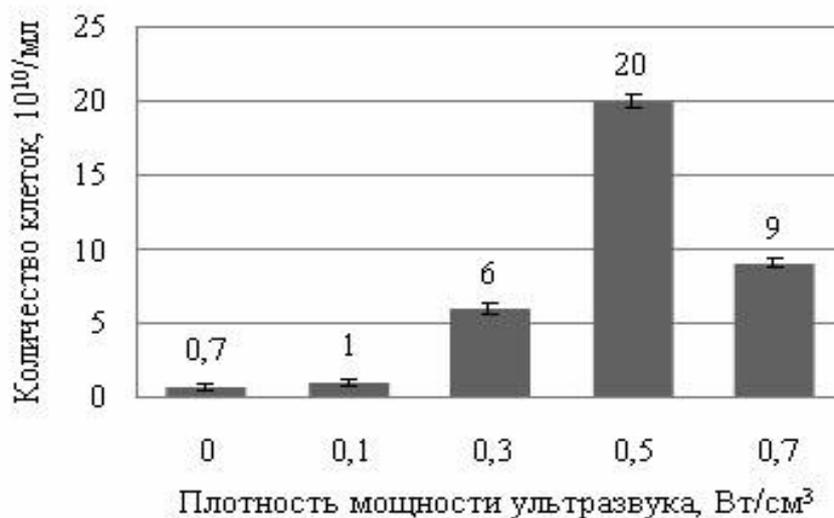


Рис. 2. Влияние ультразвуковой обработки посевного материала на количество клеток глубинной культуры *Lactococcus lactis* ВКПМ -2092 в культуральной жидкости после окончания ферментации.

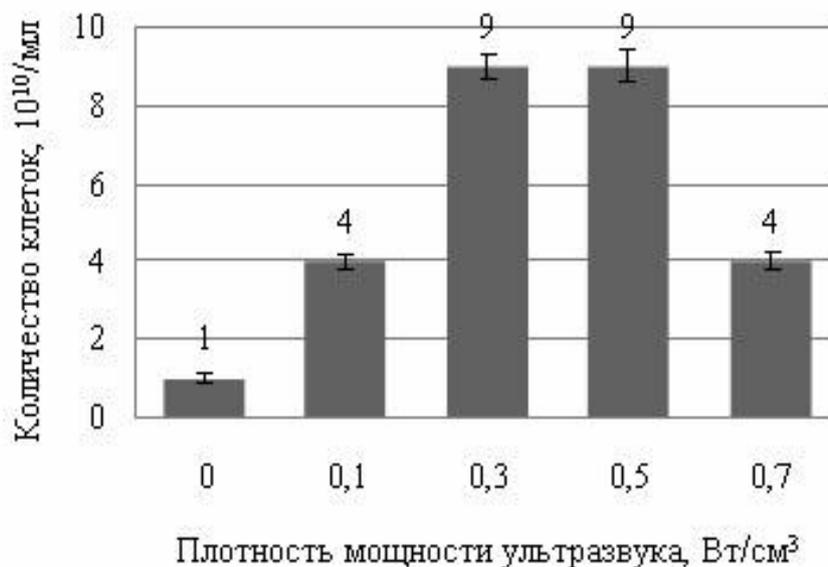


Рис. 3. Влияние ультразвуковой обработки посевного материала на количество клеток глубинной культуры *Lactococcus plantarum* ВКПМ В-4173 в культуральной жидкости после окончания ферментации.

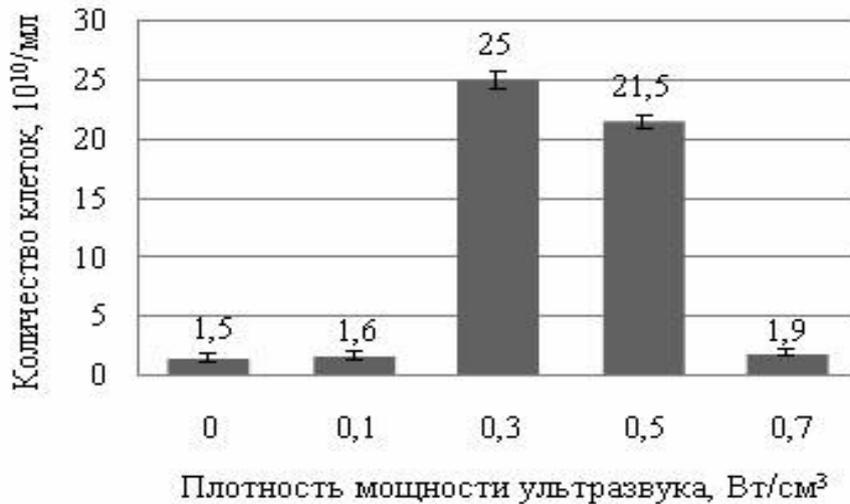


Рис. 4. Влияние ультразвуковой обработки посевного материала на количество клеток глубинной культуры *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-2092 в культуральной жидкости после окончания ферментации.

Таким образом, ультразвуковая стимуляция посевного материала обеспечивает, при прочих равных условиях, существенный прирост биомассы клеток, продуцирующих молочную и пропионовую кислоту, что повышает экономическую эффективность производства биоконсервантов на их основе.

Учитывая достаточно глубокую изученность механизмов стимулирующего действия ультразвука, доступность аппаратуры для стимуляции ультразвуком клеток в суспензии и простоту эксплуатации этой аппаратуры, можно считать весьма перспективным дальнейшее развитие биотехнологических приемов культивирования микроорганизмов с использованием ультразвука для стимуляции их роста и развития.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследование и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.580.21.0006 от 15.10.2015 г., RFMEFI58015X0006).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Акопян В.Б., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами (2-е изд.). – М.: ЮРАЙТ. – 2016. – 223 с.
- Акопян В.Б., Коржевенко Г.Н., Шангин-Березовский Г.Н. Скрытый резерв роста и развития живых систем // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1988. – № 4(380). – С. 96–105.
- Акопян В.Б., Ступин А.Ю., Хабенский Б.М., Сергеева А.В. Мордвинова Е.М. Способ получения механозависимого фактора роста человека. Патент РФ № 2523908. – 2012.
- ГОСТ Р МЭК 62127-1-2009. Общие требования к методам измерений и способам описания полей в частотном диапазоне от 0.5 до 40 МГц. М.: СтандартИнформ. – 2010. – 61 с.
- Олешкевич А.А., Кутликова И.В., Черенкова И.А. Сравнительный анализ реакции разных видов лейкоцитов на обработку ультразвуком минимальной терапевтической интенсивности / Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные вопросы науки и образования». – Тамбов. – 2015. – Т. 1. – С. 107–111.
- Шигаева М.Х. Разнообразие микроорганизмов // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2002. – №1. – С. 133–137.
- Chisti Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity // Trends in Biotechnology. – 2003. – V. 21(2). – P. 89–93.

- Lye H.S., Khoo B.Y., Karim A.A., Rusul G., Liong M.T. Ultrasound enhanced growth and cholesterol removal of *Lactobacillus fermentum* FTDC 1311 in the parent cells but not the subsequent passages // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2012. – V. 19. – P. 901–908.
- Oleshkevich A. Studies of frequency–dependent changes under modulated ultrasound exposure on cells in suspension // *International Journal of Biomedicine*. – 2015. – V. 4(1). – P. 30–34.
- Tabatabaie F., Mortazavi S.A. Effects of ultrasound treatment on viability and autolysis of starter bacteria in hard cheese // *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environment Science*. – 2010. – V. 8(3). – P. 301–304.

REFERENCES

- Akopyan, V.B., Ershov, Yu.A. (2016). *Osnovy vzaimodeistviya ultrazvuka s biologicheskimi ob'ektami*. Moscow: YURAIT (in Russian).
- Akopyan, V.B., Korzhevenko, G.N., Shangin-Berezovsky G.N. (1988). Skrytiy rezerv rosta i razvitiya zhivyyh system. *Vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki*, 4(380), 96–105 (in Russian).
- Akopyan, V.B., Stupin, A.Yu., Khabenskiy, B.M., Sergeeva, A.V., Mordvinova E.M. (2012). *Sposob polucheniya mehanozavisimogo faktora rosta cheloveka*. Patent RU 2523908 (in Russian).
- Chisti, Y. (2003). Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology*, 21(2), 89–93.
- GOST R MEK 62127-1-2009. *Obshchie trebovaniya k metodam izmerenii i sposobam opisaniya polei v chastotnom diapazone ot 0.5 do 40 MGz*. (2010). Moscow: StandartInform (in Russian).
- Lye, H.S., Khoo, B.Y., Karim, A.A., Rusul, G., Liong, M.T. (2012). Ultrasound enhanced growth and cholesterol removal of *Lactobacillus fermentum* FTDC 1311 in the parent cells but not the subsequent passages. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 901–908.
- Oleshkevich, A. (2015). Studies of frequency–dependent changes under modulated ultrasound exposure on cells in suspension. *International Journal of Biomedicine*, 4(1), 30–34.
- Oleshkevich, A.A., Kutlikova, I.V., Cherenkova, I.A. (2015). *Sravnitelniy analiz reaktsii raznyh vidov leukotsitov na obrabotku ultrazvukom minimalnoi terapevticheskoi intensivnosti*. Proceed. Int. Conf. 'Teoreticheskie i prikladnye voprosy nauki i obrazovaniya'. Tambov (in Russian).
- Shigaeva, M.Kh. (2002). Raznoobraziye mikroorganizmov. *Vestnik KazNU. Seriya biologicheskaya*, 1, 133–137 (in Russian).
- Tabatabaie, F., Mortazavi, S.A. (2010). Effects of ultrasound treatment on viability and autolysis of starter bacteria in hard cheese. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environment Science*, 8(3), 301–304.