

УДК 632.937.15

**РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НОВЫХ
БИОФУНГИЦИДОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*
В УСЛОВИЯХ ПИЛОТНЫХ БИОРЕАКТОРОВ**

Козицын А.Е., Астахов М.М., Саенко К.Ю., Иваненко Д.В.

350039, г. Краснодар, п/о 39

ФГБНУ ВНИИБЗР

KozicinAlexander@gmail.com

В ходе исследований определили оптимальные химические средства пеногашения, применяемые при культивировании штаммов-продуцентов биофунгицидов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Был проведен сравнительный анализ химических пеногасителей и технических средств пеногашения, из которых была отобрана смесь кремний-органических соединений полидиметилсилоксана и блоксополимера на основе этиленоксида и пропиленоксида, отвечающая международным биотехнологическим стандартам.

Ключевые слова: бактерии-антагонисты, культивирование, *Bacillus subtilis*, штаммы-продуценты микробиопрепаратов, биофунгициды, элементы технологии производства микробиопрепаратов, промышленные пеногасители, пилотные биореакторы.

Введение. Определяющую роль в интенсификации основных технологических процессов биотехнологических производств играют гидромеханические явления взаимодействия газов с жидкостями, лежащие в основе конвективного массопереноса и теплообмена в гетерогенных системах ферментационных установок. Многие биотехнологические и производственные процессы в биотехнологической промышленности, протекающие в системе «газ-жидкость», сопровождаются интенсивным пенообразованием, что характерно для истинных и коллоидных растворов, многокомпонентных сред, содержащих ПАВ, белки, углеводы, стабилизаторы и др. [1].

Интенсивное пенообразование в большинстве технологических процессов пищевых производств имеет негативные последствия, выражающиеся в снижении производительности оборудования, уменьшении полезного объема реакторов, нарушении регламента производства и стерильности биотехнологических процессов, увеличении потерь продуктов и загрязнении окружающей среды [2].

Активное пенообразование в процессе производства биопрепаратов на ферментационном оборудовании (BTC EDF-100.1 и BTC VRE 150.1) может привести к накоплению давления в биореакторах путём закупорки пор фильтров, отводящих газы из системы ферментационной установки в процессе аэрации, что может привести к поломке оборудования и травмированию персонала. В процессе аэрации возможен выход пены через отвод воздуха, что приводит к потере бактериальной массы и выносу полезного материала из ферментационной системы вследствие флотации [3].

В биореакторах пенообразование порой является серьезной проблемой, связанной с необходимостью аэрирования содержимого, в котором постоянно присутствуют продукты распада жиров, углеводы и белки, составные компоненты питательного субстрата, проявляющие поверхностно-активные свойства [4]. Об-

разующийся слой пены может как способствовать росту аэробных микроорганизмов, так и препятствовать (например для микроаэрофилов) [5, 6].

Цель и задачи исследования. Установить оптимальные средства пеногашения, обладающие необходимыми экономическими и биологическими характеристиками, технологическими параметрами и разрешёнными к применению в сельскохозяйственной биотехнологии, согласно стандартам FDA и ISO, а также совместимыми со штаммами бактерий *B. subtilis* BZR 336g и BZR 517.

Провести первичный скрининг разрешенных средств пеногашения согласно действующим международным стандартам. Провести отбор средств пеногашения по предъявляемым технологическим параметрам. Оценить совместимость исследуемых средств пеногашения со штаммами бактерий *B. subtilis* BZR 336g и BZR 517.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили штаммы-продуценты лабораторных образцов биофунгицидов из рабочей коллекции микроорганизмов ВНИИ биологической защиты растений: *Bacillus subtilis* BZR 336g, *B. subtilis* BZR 517.

Для получения жидкой культуры (ЖК) бактерий-антагонистов осуществляли их культивирование в пилотных биореакторах BTC EDF-100.1 и BTC VRE 150.1 объемом 100 и 150 л. Маточную культуру получали методом внесения агаризованных блоков с исследуемыми штаммами в конические колбы и последующим культивированием в термостатированных шейкерах-инкубаторах New Brunswick Scientific Excella E25 при скорости вращения 180 об./мин и температуре 30 °С, срок культивирования – 48 часов.

Для оценки эффективности средств пеногашения использовали пневмобарботажный метод определения характеристики пены. Метод заключается в пропускании потока воздуха через перфорированный рассекающий диспергатор воздуха, находящийся в стеклянном цилиндре, заполненном на 40-50% культуральной средой, отобранной в финальной стадии культивирования штаммов-продуцентов лабораторных образцов биофунгицидов. По интенсивности пенообразования и скорости оседания пены при выключённом барботёре определяли эффективность пеногасителя. Технологические характеристики пеногасителей определяли на основе литературных данных и путём опытного сравнения.

За основу нами были взяты наиболее часто используемые средства пеногашения, применяемые в биотехнологии на различных промышленных ферментационных установках, отвечающие технологическим требованиям и международным разрешающим документам (стандарты FDA и ISO), а так же имеющие наибольшую экономическую целесообразность.

Требования, выдвигаемые нами к пеногасителям:

- долгосрочный эффект в среде с изменяющимся значением pH;
- отсутствие образования конгломератов, способных закупоривать биотехнологическое и сельскохозяйственное оборудование;
- самоэмульгирующая способность;
- отсутствие видимых включений, ухудшающих товарный вид продукта;
- диспергируемость / разбавляемость;
- совместимость с бактериями-продуцентами;
- теплостойкость водной эмульсии в процессе стерилизации при 110 °С в течении 30 мин;
- разрешения для применения в пищевой промышленности.

Для сравнения были отобраны следующие вещества и подходы для пеногашения:

- растительное масло подсолнечника;
- вазелиновое масло;
- неионогенные ПАВ;
- ионогенные ПАВ (на основе алкилсульфатов);
- смесь эфиров жирных кислот и неионогенных компонентов;
- смесь ЕО-РО-сополимеров;
- 20%-ная водно-масляная эмульсия полидиметилсилоксана и блоксополимера на основе этиленоксида и пропиленоксида;
- механический пеногаситель производства Exergy, heat exchangers #00456, работающий по принципу конденсации пены и возвращению её в ёмкость биореактора.

Пенообразование штаммов-продуцентов биопрепаратов *B. subtilis* BZR 336g и BZR 517 было оценено визуально в процессе культивирования. Динамика пенообразования наблюдалась при однородных условиях аэрирования, параметрах перемешивания среды (100 rpm магнитной мешалки), расходе стерильного воздуха для аэрации (0,6 м³/ч).

Результаты и обсуждение. Для определения необходимости использования химических средств пеногашения при производстве биофунгицидов на основе штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517, проводили их культивирование на жидкой питательной среде. Оба штамма-продуцента были оценены, как активно образующие стойкую пену, не разрушаемую при постоянном механическом перемешивании после 10 часов культивирования, что говорит о необходимости подбора оптимального способа пеногашения.

Определены общие для штаммов-продуцентов BZR 336g и BZR 517 подходы пеногашения в процессе наработки биомассы.

Сравнительный анализ различных подходов пеногашения в условиях плотного культивирования лабораторных образцов биопрепаратов позволил определить способ пеногашения, отвечающий наибольшему числу технологических требований. Было показано, что смесь полидиметилсилоксана и блоксополимера на основе этиленоксида и пропиленоксида приводила к снижению плотности пены и эффект удерживался в течении всего срока культивирования, смесь хорошо показала себя в процессе стерилизации при 110 °С в течении 30 минут и не снижала эффективности пеногашения. Данная смесь разрешена к использованию в пищевом, фармацевтическом и косметическом производстве согласно стандартам FDA и ISO. Количество жизнеспособных клеток бактерий штаммов-продуцентов BZR 336g в результате культивирования с применением данного пеногасителя составили $7,8 \times 10^9$ КОЕ/мл, что соответствует техническим характеристикам современных биопрепаратов для сельского хозяйства.

Заключение. Установлен оптимальный пеногаситель, обладающий необходимыми экономическими и биологическими характеристиками, а также технологическими параметрами и разрешённый к применению в сельскохозяйственной биотехнологии, согласно стандартам FDA и ISO. Данное средство пеногашения совместимо с используемыми технологическими штаммами-продуцентами биофунгицидов BZR 336g *B. subtilis* и BZR 517 *B. subtilis*; не является поллютантом, биоразлагаемо и не увеличивает нагрузку на экологическое состояние окружающей среды.

Литература

1. Четвериков С.П., Асабина Е.А., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для промышленного производства биопрепарата «Елена» // Башкирский химический журнал. 2006. – Том 13. – №2. – С. 10-13.
2. Ветошкин А.Г., Чагин Б.А. Пенoгашение в пищевой промышленности // Научно-практическая конференция "Техника и технологии пищевых производств на рубеже 21 века", Пензенский государственный университет. – 2000. – 64 с.
3. Городисская Ю.В., Козицын А.Е., Отрошко Д.Н. и др. Использование эффекта флотации для концентрации клеток углеводородокисляющих родококков // Материалы Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и охраны окружающей среды». – Барнаул: Алтайский гос. Университет, 2012 г.
4. Asaturova A.M., Nomyak A.I., Tomashevich N.S. *at al.* Conditions for the cultivation of new Bacillus bacteria being micro bioproduct producers // Journal of Pure and Applied Microbiology – Vol. 9. – № 4. – 2015. – P. 2797-2804.
5. Введение в биотехнологию: Курс лекций:/ А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев. – Мн.: БГУ, 2002. – 105 с.
6. Худокормов А.А., Козицын А.Е. Особенности применения технологии биоремедиации нефтезагрязненных почв в ЮФО // Сборник материалов VI Всероссийской с международным участием научно-практической конференции "Формирование и реализация экологической политики на региональном уровне – Ярославль. – 2013. – С. 355-357.

DEVELOPMENT OF ELEMENTS FOR THE CULTIVATION TECHNOLOGY OF NEW BIOFUNGICIDES BASED ON THE BACTERIA OF THE *BACILLUS* GENUS IN THE CONDITIONS OF PILOT BIOREACTORS

Kozitsyn A.E., Astakhov M.M., Saenko K.Yu., Ivanenko D.V.

In the course of the research, the authors determined the optimal chemical defoaming agents used in the cultivation of producer strains of biofungicides of *Bacillus subtilis* BZR 336g and *B. subtilis* BZR 517. The authors conducted a comparative analysis of chemical defoaming agents and technical means of defoaming, from which a mixture of silicon-organic compounds of polydimethylsiloxane and block copolymer based on ethylene oxide and propylene oxide was chosen, meeting international biotechnological standards.

Keywords: Bacteria antagonists, cultivation, *Bacillus subtilis*, producer strains of microbiopreparations, biofungicides, elements of the production technology of microbiological preparations production, industrial defoaming agents, pilot bioreactors.