



Научная статья

УДК 579.872.1:579.22

DOI: 10.52957/27821900_2022_03_08

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

И. Н. Павлов, О. Н. Гора

Игорь Николаевич Павлов, канд. техн. наук, доцент; Оксана Николаевна Гора, аспирант

Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, Бийск, Россия, rawlow-in@mail.ru; gorao@bk.ru

Ключевые слова:

пропионовокислые бактерии, *Propionibacterium freudenreichii*, культивирование, оптимизация процесса, питательная среда, метод Бокса-Уилсона, витамин B₁₂, полнофакторный эксперимент

Аннотация: На основании результатов собственных исследований и анализа литературных данных предложены условия и состав питательной среды для культивирования пропионовокислых бактерий. В качестве инокулята использован концентрат пропионовокислых бактерий, который содержит клетки селективных штаммов *Propionibacterium freudenreichii*. В составе питательной среды на постоянном уровне поддерживались концентрации: инокулята - 5% об., хлорида кобальта CoCl₂ в дозировке 20 мг/л, а также концентрация гидролизованного молока - 5% об. Варьируемыми в составе питательной среды являлось содержание: дрожжевого автолизата, аскорбиновой кислоты, сульфата аммония, лактозы. Полученную смесь культивировали в термостате 7 суток при температуре 30 °С при рН среды 7,0. Оптимизация процесса культивирования проводилась по методу Бокса - Уилсона. Методом математического планирования построен план полного факторного эксперимента ПФЭ 2ⁿ, что позволило оптимизировать питательную среду для культивирования пропионовокислых бактерий с наибольшим приростом биомассы бактерий и накоплением витамина B₁₂. Подобраны оптимальные условия культивирования для накопления биомассы *Propionibacterium freudenreichii*, при которых максимальное значение биомассы на 5 сутки культивирования составляет 60,5 г/л с высоким содержанием жизнеспособных клеток пробиотических бактерий 12×10¹² КОЕ/см³ и максимальным накоплением витамина B₁₂ на 5 сутки культивирование равным 108,1 мкг/мл.

Для цитирования:

Павлов И.Н., Гора О.Н. Математическое планирование культивирования пропионовокислых бактерий // От химии к технологиям шаг за шагом. 2022. Т. 3, вып. 3. С. 8-16. URL: <http://chemintech.ru/index.php/tor/2022tom3no3>

Введение

Человеческий организм является биологической системой, жизнедеятельность которой тесно связана с окружающим миром. В результате воздействия антропогенных факторов - экологических условий, стрессов, неадекватного питания, применения антибиотиков, медикаментов, избыточного потребления углеводов происходит качественное



и количественное изменение состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. При этом нарушается нормальное пищеварение – пища переваривается частично, начинают развиваться патогенные и условно-патогенные бактерии и дрожжи рода *Candida* [1-3]. Для профилактики последствий нарушений пищеварения и развития сопутствующих заболеваний требуется разработка и расширение производства биологически активных добавок, в том числе на принципах биотехнологии. В частности, к таким продуктам относятся продукты, содержащие высокоактивные живые бактерии или произведенные ими продукты [4-6]. Разработаны технологии их производства в жидкой или сухой формах из микробных культур (бифидобактерий, лактобактерий, пропионовокислых бактерий и др.) [7, 8], которые имеют высокую активность [9, 10].

Особенно интересны в использовании пропионовокислые бактерии. Им присущи антимутагенные и иммуногенные действия, а также способность накапливать в процессе жизнедеятельности витамина В₁₂ [11]. Поэтому препараты, использующие в своей основе пропионовокислые бактерии, являются всегда востребованными. Перспективным является повышение уникальности выпуска данных препаратов, а также использование инноваций при производстве пропионовокислых бактерий с целью повышения свойств продуктов. В частности, для применения препаратов актуальным является решение задачи по обеспечению условий для увеличения сохранности, которые создаются, прежде всего, экономическими обстановкой на производстве. Особое внимание уделяется технологии получения препаратов в сухой форме.

Целью исследования является поиск оптимальных условий по соотношению компонентов питательной среды, используемой для развития пропионовокислых бактерий для создания условий по максимальному приросту биомассы культивируемых бактерий и производства в процессе их жизнедеятельности наибольшего количества витамина В₁₂. В качестве определяющих факторов, для решения поставленной задачи, рассмотрены: выбор питательной среды и определение соотношения компонентов, а также условия культивирования (температура, рН, концентрация).

Экспериментальная часть

Фактором повышения устойчивости при удалении влаги выступает, прежде всего, решение задачи оптимизации состава питательной среды для культивирования пропионовокислых бактерий. В качестве основного компонента питательной среды для культивирования пропионовокислых бактерий выбрана молочная сыворотка [12]. Применение сыворотки для культивирования пропионовокислых бактерий объясняется содержащимися в ней углеводами (лактозы и глюкозы), липидами и молочного жира, легкоусвояемого белка (казеина, альбумина и глобулина); витаминами группы В, аскорбиновой и пантотеновой кислот, токоферола, органическими кислотами (молочной и уксусной, лимонной и муравьиной), минеральными компонентами (фосфора и магния, кальция и хлора, цинка и натрия, калия и железа, йода, кобальта и молибдена), и аминокислотами.



Для развития пропионовокислых бактерий подобрана питательная среда, на основе которой проводилась отработка по соотношению компонентов для повышения накопления биомассы пропионовокислых бактерий. Компоненты, входящие в среду: молочная сыворотка, дрожжевой автолизат, гидролизованное молоко, аскорбиновая кислота, сульфат аммония, буфер, лактоза и хлорид кобальта. На постоянном уровне поддерживались концентрации: инокулята – 5% об., хлорида кобальта CoCl_2 в дозировке 20 мг/л, а также концентрация гидролизованного молока – 5% об. Инокулятом является концентрат пропионовокислых бактерий, содержащий клетки штаммов *Propionibacterium freudenreichii*, характеризующиеся повышенной температурой второго нагревания. Из работ других авторов известно, что инокулят для культивирования и накопления биомассы *Propionibacterium freudenreichii* является оптимальным и содержится в количестве 5% от объема в среде питания. Такое количество инокулята позволяет добиться оптимальный прирост биомассы и синтез витамина B_{12} , а также ведет к удешевлению конечного продукта. Из работ других авторов также известно, что оптимальная концентрация гидролизованного молока составляет 5% в объеме среды питания [13]. Температура 30 °С и продолжительность процесса 7 суток приняты на основе данных исследований других авторов для культивирования *Propionibacterium freudenreichii*. По проведенным предварительным испытаниям содержание хлорида кобальта CoCl_2 в дозировке 20 мг/л дает наибольшее значение по количеству витамина B_{12} и производит наименьшее угнетение бактерий при развитии [14]. Варьируемыми компонентами в среде питания принято содержание: дрожжевого автолизата, аскорбиновой кислоты, сульфата аммония, лактозы. Полученная смесь культивировалась в термостате 7 суток при температуре 30 °С при рН среды 7,0. Оптимизации условий культивирования пропионовокислых бактерий проводилась по методу Бокса – Уилсона с использованием математического планирования при построении полного факторного эксперимента ПФЭ 2^n , где n – количество варьируемых факторов [15].

Результатом обработки двухфакторного эксперимента является получение линейной модели:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n, \quad (1)$$

где $b_0, b_1, b_2, \dots, b_n$ – коэффициенты регрессии; x_1, x_2, \dots, x_n – значения варьируемых факторов в кодированном виде.

Коэффициенты регрессии уравнения рассчитывались по средним результатам N опытов, пользуясь соответствующими формулами [16]:

- свободный коэффициент уравнения:

$$b_0 = \frac{\sum_{u=1}^N \bar{y}_u}{N}, \quad (2)$$

- коэффициенты регрессии i -го фактора:

$$b_1 = \frac{\sum_{u=1}^N x_{iu}\bar{y}_u}{N}, \quad (3)$$



где x_{iu} – величина изменяемого значения в столбце таблицы планирования; \bar{y}_u – результат u -го эксперимента, среднее арифметическое значение; N – суммарное количество опытов; u – нумерация варианта эксперимента; i – номер фактора.

Значения коэффициентов влияют на процесс в том случае, если соблюдается неравенство

$$|b_i| > t \sqrt{S_b^2}, \quad (4)$$

где $\sqrt{S_b^2}$ – ошибка нахождения коэффициента; t – критерий Стьюдента, который определяется уровнем значимости и числом степеней свободы; S_b^2 – дисперсии воспроизводимости.

Для нахождения количества биомассы бактерий использовался метод взвешивания. По этому методу биомасса, полученная после выращивания бактерий, отделяется от жидкой фазы в центрифуге и направляется на взвешивание [17].

Нахождение содержащегося витамина B_{12} проводилось методом спектрофотометрическим. По методу клетки бактерий сначала отделяются, затем проводится их промывка для перехода кобаламинов с помощью гидролиза в водный раствор. После этого на гидролизат производится воздействие светом, в результате чего кобаламин преобразуется в оксикобаламин, и далее находится оптическая плотность при использовании длины волны света 530 нм. Полученное значение определяет количество кобаламина.

Результаты, их обсуждение

Выбор основного уровня варьируемых факторов проводился по результатам данных экспериментальных работ ряда авторов [13, 18]. Для выявления оптимальных условий развития пропионовокислых бактерий спланирован и реализован двухуровневый полнофакторный эксперимент ПФЭ 2^4 . Варьируемыми факторами приняты: X_1 – концентрация дрожжевого автолизата, %; X_2 – концентрация аскорбиновой кислоты, %; X_3 – содержание сульфата аммония, г/л; X_4 – содержание лактозы, г/л. Критерий оптимизации Y – биомасса пропионовокислых бактерий. Значения уровней факторов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Факторы и значения уровней

Уровни	Факторы			
	X_1	X_2	X_3	X_4
Основной	5,0	0,1	3,0	5,0
Интервал варьирования	0,5	0,05	0,3	0,5
Верхний	5,5	0,15	3,3	5,5
Нижний	4,5	0,095	2,7	4,5

Матрица планирования представлена в таблице 2. Согласно представленному плану готовились 16 сред, где исчерпаны все возможные комбинации изученных факторов на двух уровнях. Нарращивание биомассы проводилось до окончания экспоненциальной фазы в течение 5 суток, доза вносимого инокулята бактерий составляет 5%. В среду включён хлористый кобальт для повышения витаминсинтезирующей способности пропионовокислых бактерий в дозировке 20 мг/л. Опыты проводились в трех повторностях.

Таблица 2. Матрица планирования ПФЭ 2⁴

№ п/п	В натуральном виде				В кодированном виде			
	Дрожжевой автолизат, %	Аскорбиновая кислота, %	Сульфат аммония, г/л	Лактоза, г/л	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	4,5	0,95	3,3	4,5	-1	1	-1	-1
2	4,5	0,15	2,7	5,5	-1	-1	-1	1
3	4,5	0,95	2,7	5,5	-1	-1	1	1
4	4,5	0,15	3,3	4,5	-1	1	1	-1
5	5,5	0,95	2,7	5,5	1	-1	-1	1
6	5,5	0,15	3,3	4,5	1	1	-1	-1
7	5,5	0,95	3,3	4,5	1	1	1	-1
8	5,5	0,15	2,7	5,5	1	-1	1	1
9	4,5	0,95	2,7	4,5	-1	-1	-1	-1
10	4,5	0,15	3,3	5,5	-1	1	-1	1
11	4,5	0,95	3,3	5,5	-1	1	1	1
12	4,5	0,15	2,7	4,5	-1	-1	1	-1
13	5,5	0,95	3,3	5,5	1	1	-1	1
14	5,5	0,15	2,7	4,5	1	-1	-1	-1
15	5,5	0,95	2,7	4,5	1	-1	1	-1
16	5,5	0,15	3,3	5,5	1	1	1	1

Результаты экспериментов обрабатывали для получения уравнения линейной модели (1). Определение величин коэффициентов входящих в уравнение проводилось по средним результатам N опытов по уравнениям (2) и (3). По средним результатам 16 опытов получены коэффициенты:

$$b_0 = 43,4, b_1 = 1,2; b_2 = 1,36; b_3 = -0,10; b_4 = 1,11.$$

Знак (+) полученного коэффициента показывает, что при росте значения фактора будет увеличиваться величина биомассы бактерий, знак (–), наоборот, что происходит уменьшение параметра оптимизации, т.е. нарастания биомассы.

Значимость коэффициентов регрессии осуществлялась при использовании коэффициента Стьюдента по уравнению (4). Критерий Стьюдента $t = 2,04$, определенный при уровне значимости 0,05 и степени свободы:

$$f = (n - 1)N = (3 - 1)16 = 32,$$

где n – количество повторений каждого эксперимента; N – количество проведенных экспериментов.

Обработка экспериментальных и расчетных данных позволяет найти величину дисперсии воспроизводимости $S_b^2 = 0,102$. Значение коэффициента регрессии является влияющим на процесс согласно уравнению (4) при выполнении неравенства

$$|b_i| > 2,04 \cdot \sqrt{0,102} = 0,652. \quad (5)$$

В результате получено, что неравенство не выполняется для третьего значения коэффициента регрессии, поэтому третий фактор является незначимым в составе питательных сред на культивирование пропионовокислых бактерий.

Таким образом, уравнение регрессии с учетом значимых коэффициентов принимает вид

$$y = 43,4 + 1,2x_1 + 1,4x_2 + 1,1x_4.$$



Далее произведен расчет по программе крутого восхождения. Для процесса культивирования рассчитаны шесть новых питательных сред. При этом исходный уровень принимался за центр планирования. От исходного уровня рассчитывались шаги, при которых к значению предыдущего уровня, в зависимости от полученного знака критерия регрессии, добавляется значение шага или вычитается. По фактору, который имеет наибольшее влияние, последний шаг является равным его минимальному либо максимальному уровню. Таким образом, определены шесть составов сред восхождения. Поскольку третий фактор согласно полученному неравенству (5) не оказывает влияние на процесс, то уровень во всех составах оставалось равным исходному. В таблице 3 приведены результаты расчетов.

Таблица 3. Среды для реализации крутого восхождения

Среда №	X_1	X_2	X_3	X_4
1	5,28	0,17	3,0	5,28
2	5,56	0,23	3,0	5,56
3	5,84	0,30	3,0	5,84
4	6,12	0,36	3,0	6,12
5	6,40	0,43	3,0	6,40
6	6,67	0,49	3,0	6,67
Компоненты	Дрожжевой автолизат, %	Аскорбиновая кислота, %	Сульфат аммония, г/л	Лактоза, г/л
Основной уровень	5,0	0,1	3,0	5,0

В ходе проведения каждого опытов проводилось нахождение количества биомассы пропионовокислых бактерий и количество накапливаемого витамин В₁₂ в течение 7 суток. Результаты накопления биомассы по программе крутого восхождения представлены в виде графической зависимости на рис. 1.

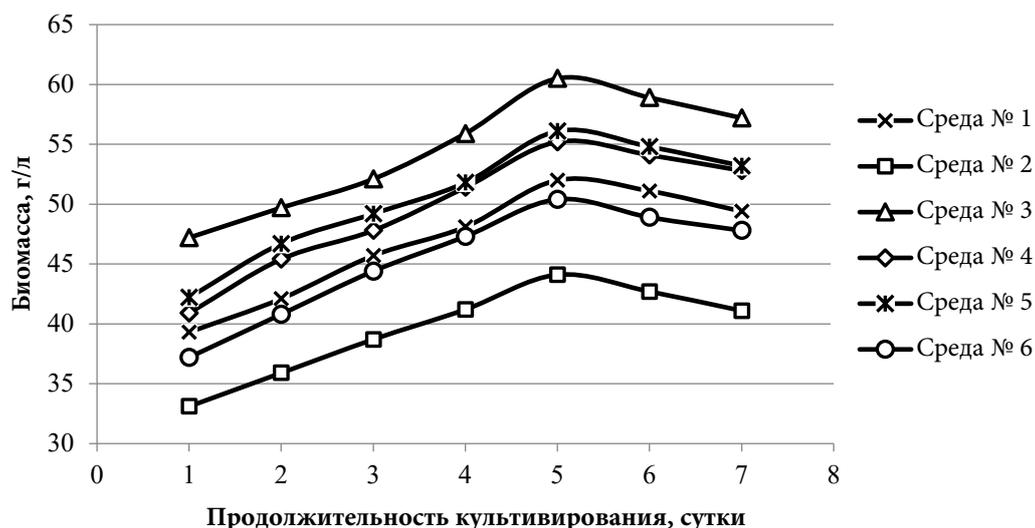


Рис. 1. Динамика накопления биомассы бактериями *Pr. freudenreichii* в зависимости от состава питательной среды по программе крутого восхождения

По результатам экспериментов показано, что наибольшее накопление биомассы бактерий происходит при культивировании на среде под номером 3 (см. табл. 3) с достижением максимального значения на 5-е сутки культивирования равное 60,5 г/л. Из



графика изменения накопления биомассы видно, что первые пять суток идет активное накопление биомассы, после чего наблюдается падение содержания бактерий в питательной среде. После пяти суток культивирования происходит истощение питательной среды по компонентам и их совместное действие не оказывает стимулирования для дальнейшего синтезирования бактерий.

Результаты по уровню содержания витамина B_{12} по программе крутого восхождения представлены в виде графической зависимости на рис. 2.

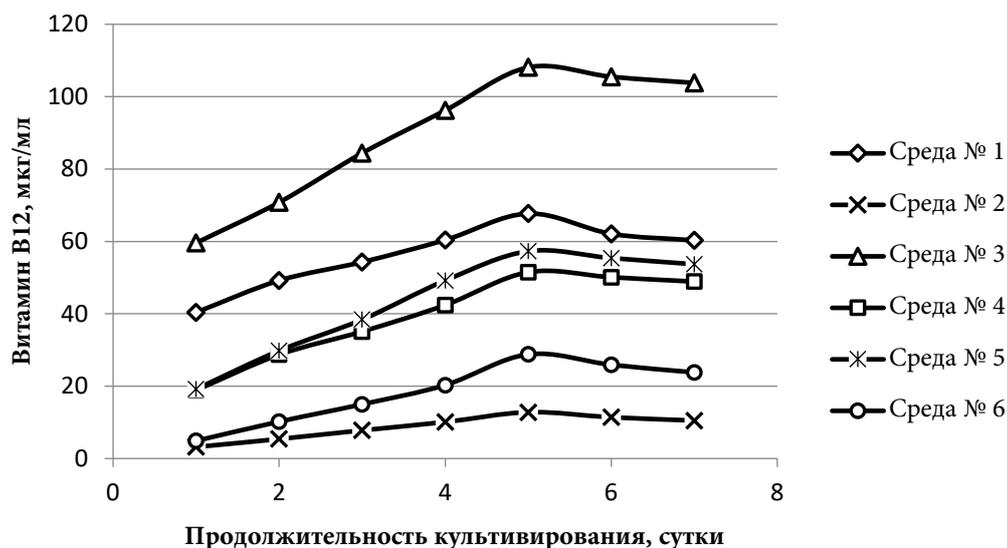


Рис. 2. Накопление витамина B_{12} в зависимости от состава питательной среды по программе крутого восхождения

Оптимальным составом для накопления витамина B_{12} также является среда под номером 3 (см. табл. 3). Максимальное значение витамина на 5-е сутки культивирования достигает 108,1 мкг/мл. Из графика изменения накопления витамина B_{12} видно, что первые пять суток идет активное накопление. Максимальный уровень витамина достигается на 5-е сутки, после чего наблюдается падение уровня накопления витамина в питательной среде. Ряд наиболее важных характеристик жидкой закваски приведен в таблице 4.

Таблица 4. Качественные характеристики жидкой закваски по результатам оптимизации

Показатели	Характеристики
Вкус и запах	Приятный кисломолочный привкус, специфический для данного продукта, без посторонних запахов
Консистенция	Однородная с умеренной вязкостью
Биомасса бактерий, г/л	60,5
Витамин B_{12} , мкг/мл	108,1
Количество пропионовокислых бактерий, КОЕ/см ³	12×10^{12}

Выводы

Методом математического планирования построен план полного факторного эксперимента ПФЭ 2ⁿ. По результатам решения задачи оптимизации определены оптимальный состав среды для питания и условия для развития пропионовокислых бактерий



Propionibacterium freudenreichii, позволяющие добиться наибольшего прироста биомассы бактерий с высоким титром жизнеспособных клеток и наибольшего содержания витамина В₁₂. Оптимальный состав среды: инокулят – 5% об.; молочная сыворотка – 5% об.; гидролизованное молоко – 5% об.; хлорид кобальта – 20 мг/л; дрожжевой автолизат – 5,84% об.; аскорбиновая кислота – 0,30% об.; сульфат аммония – 3,0 г/л; лактоза – 5,84 г/л. Подобраны оптимальные условия, при которых максимальный прирост пропионово-кислых бактерий достигается на 5-е сутки культивирования и составляет 60,5 г/л с высоким значением жизнеспособных клеток пробиотических бактерий 12×10^{12} КОЕ/см³. Накопление витамина В₁₂ достигается также на 5-е сутки культивирования и составляет 108,1 мкг/мл.

Список источников

1. Tang W.H.W., Hazen S.L., Kitai T. Gut microbiota in cardiovascular health and disease // *Circulation Research*. 2017. Vol. 120, no. 7. P. 1183-1196. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
2. Zoumpoulou G., Tsakalidou E., Papadimitriou K., Pot B. Dairy probiotics: beyond the role of promoting gut and immune health International // *Dairy Journal*. 2017. No. 67. P. 46-60. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.09.010.
3. Cousin F.J., Jan G., Mater D.D.G., Foligné B. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence // *Dairy Science & Technology*. 2011. Vol. 91, no. 1. P. 1-26. DOI: 10.1051/dst/2010032.
4. Ammar E.M., Philippidis G.P. Fermentative production of propionic acid: prospects and limitations of microorganisms and substrates // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021. Vol. 105. P. 6199-6213. DOI: 10.1007/s00253-021-11499-1.
5. Piwożarek K., Lipińska E., Hać-Szymanczyk E., Kot A.M., Kictiszek M., Bonin, S. Use of *Propionibacterium freudenreichii* T82 strain for effective biosynthesis of propionic acid and trehalose in a medium with apple pomace extract and potato wastewater // *Molecules*. 2021. Vol. 26, no. 13. P. 3965.
6. Ammar E.M., Wang Z., Yang S.T. Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii* for n-propanol production // *Applied microbiology and biotechnology*. 2013. Vol. 97, no. 10. P. 4677-4690.
7. Орлова Т.Н., Функ И.А., Отт Е.Ф., Дорофеев Р.В. Пропионовокислые бактерии и их значение // *Сыроделие и маслоделие*. 2020. № 1. С. 28-29. DOI: 10.31515/2073-4018-2020-1-28-29.
8. Begunova A.V., Rozhkova I.V., Zvereva E.A., Glazunova O.A., Fedorova T.V. Lactic and propionic acid bacteria: the formation of a community for the production of functional products with bifidogenic and hyposensitive properties // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. Vol. 55, no. 6. P. 660-669. DOI: 10.1134/S0003683819060048.
9. Исаева А.В. Пропионовокислые бактерии и их особенности // *Международный академический вестник*. 2018. № 3 (23). С. 64-66.
10. Ammar E.M., Jin Y., Wang Z., Yang S.-T. Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii*: effect of expressing phosphoenolpyruvate carboxylase on propionic acid production // *Applied Microbiology Biotechnology*. 2014. Vol. 98. P. 7761-7772. DOI: 10.1007/s00253-014-5836-y.
11. Piwożarek K., Lipińska E., Hać-Szymańczyk E., Kieliszek M. *Propionibacterium* spp. - source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry // *Applied Microbiology Biotechnology*. 2018. Vol. 102. P. 515-538. DOI: 10.1017/s00253-017-8616-7.
12. Хамагаева И.С. Перспективы использования пробиотических микроорганизмов в современной биотехнологии // *Вестник ВСГУТУ*. 2014. № 5 (50). С. 111-116.
13. Хамагаева И.С. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий. Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006.
14. Гора О.Н., Павлов И.Н. Исследование некоторых основных факторов, определяющих получение сухих препаратов пропионовокислых бактерий // *Техника и технология пищевых производств*. 2011. № 4. С. 78-81.



15. **Адлер Ю.П.** Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю.П. Адлер, Е.В. Маркова, Ю.В. Грановский. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во «Наука», 1976.
16. **Грачев Ю.П.** Математические методы планирования экспериментов: Учебник для вузов по спец. «Технология микробиологических производств». М.: Пищевая промышленность, 1979.
17. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под. ред. А.И. Нетрусова. М.: Издат. центр «Академия», 2005. 608 с.
18. **Митьпова Н.В.** Разработка технологии концентрированной закваски на основе симбиоза пробиотических бактерий: автореф. дис. ... канд. техн. наук. Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2007.

Поступила в редакцию 21.06.2022

Одобрена после рецензирования 12.09.2022

Принята к опубликованию 12.09.2022