

Quality”. – Trends in Genetics, 2006. – Vol. 22, Issue 9, pp. 426–433. – p. 428–430.

5. Horatius. Odes. – Translation by C.E. Bennett. Cambridge: Harvard University Press, 1914. – Book I, Ode 27.

6. Catullus. Carmina. – Translation by F.W. Cornish. London: Heinemann, 1912. – Poem XIII.

7. Columella. De Re Rustica. – Translation by H.B. Ash. Cambridge: Harvard University Press, 1941. – Book III, Chapter 3.

8. Jackson R.S. Wine Science: Principles and Applications. – Academic Press, 2014. – 776 p. – p. 112–115.

УДК 579.62

Д. С. Ковальская, науч. сотр., Н. А. Ванькевич, науч. сотр.,
Д. В. Шмыга, инж. 1 кат., И. А. Проскурнина, зав. лаб.,
Н. В. Сверчкова, канд. биол. наук, доц.,
зам. ген. дир. по науч. работе, гл. науч. сотр.
(ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», г. Минск)

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИДКОЙ И СУХОЙ ФОРМЫ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *VACILLUS*

Культуральная жидкость – это сложная и гетерогенная смесь, образующаяся в процессе культивирования микроорганизмов. Она представляет собой смесь, содержащую непосредственно микробные клетки, целевые метаболиты (например, антибиотики, витамины, ферменты, биополимеры), а также побочные продукты метаболизма. Кроме того, культуральная жидкость включает остатки неиспользованных компонентов питательной среды (сахара, аминокислоты, минеральные соли, витамины), и, зачастую, пеногасители, добавляемые для предотвращения чрезмерного пенообразования. Технология извлечения целевого продукта из культуральной жидкости напрямую зависит от природы этого продукта и требуемой товарной формы (порошок, гранулы, раствор). В большинстве биотехнологических производств первый этап переработки – это отделение микробной биомассы от культуральной жидкости. Одним из наиболее распространенных методов разделения является центрифугирование (сепарация), позволяющее эффективно отделять клетки от жидкости, особенно в случаях работы с большими объемами и труднофилтруемыми культуральными жидкостями. Скорость и эффективность центрифугирования значительно зависят от ряда факторов. Ключевыми являются: вид микроорганизма, состав питательной среды, степень потребления питатель-

ных веществ и длительность ферментации. Наличие значительных количеств неиспользованных питательных веществ, липидов, и пеногасителей негативно влияет на фильтруемость и требует дополнительных стадий очистки. В связи с чем как способ фракционирования выбрали пропускание культуральной жидкости через проточную центрифугу.

Целью работы было исследовать эффективность проточной центрифуги как способа отделения биомассы от супернатанта и подобрать оптимальный режим фракционирования.

Объектом исследования служила кормовая добавка для мелкого рогатого скота на основе бактерий рода *Bacillus*. Отработку режимов осуществляли с помощью проточной центрифуги GQ-75 с рабочим объемом ротора 2 дм³. В качестве параметров оптимизации фракционирования были выбраны скорость вращения ротора (об/мин) и скорость подачи культуральной жидкости в центрифугу. Параметром интенсивности протекания процесса и степени фракционирования служила полученная в процессе осаждения биомасса и остаточный титр пробиотических бактерий в супернатанте. Измерение уровня секретруемых ферментов проводили количественными методами (количество протеазы методом Ансона в модификации И.С. Петровой и М.М. Винцюнайте при длине волны 280 нм, целлюлазы – согласно инструкции анализа Assay of endo-1,4- β -Glucanase (Cellulase) using Azo-CM-Cellulose ©Megazyme International при длине волны 590 нм, альфа-амилазы – согласно инструкции анализа Assay of alpha-amylase using Red-Starch ©Megazyme International при длине волны 510 нм, эндо-1,4- β -ксилазы – при 590 нм по способности гидролизовать 4-О-метил-D-глюкуроно-D-ксилан окрашенный ремазолом бриллиантовым синим R «Sigma-Aldrich» согласно инструкции производителя) [1].

Антимикробную активность в отношении условно-патогенных тест-объектов определяли методом лунок [2]. Чашки инкубировали при 28–30 °С, результаты оценивали на 2-е сутки по диаметру зон ингибирования патогенов. Полученные данные использовали после статистической обработки, при которой определяли средние арифметические и стандартные отклонения [3]. Скорость вращения ротора варьировали от 12 000 до 20 000 об/мин с шагом в 2 000 об/мин, скорость подачи – от 500,0 до 1 250 мл/мин с шагом в 250 мл. Подбор скорости вращения ротора осуществляли при минимальной подаче культуральной жидкости (500 мл/мин). В результате исследования была определена оптимальная скорость вращения ротора для получения биомассы из культуральной жидкости: 18 000 $\pm$ 500 об/мин, при которой остаточный титр бактерий в супернатанте составил

$3,27 \pm 0,86 \times 10^4$ КОЕ/мл, что в сравнении с титром контроля (культуральная жидкость), который составил $4,37 \pm 0,83 \times 10^9$ КОЕ/мл, позволило снизить содержание клеток бактерий в КЖ на 5 порядков. Более низкая скорость вращения ротора снижала эффективность отделения биомассы: остаточный титр составил от $7,40 \pm 0,86 \times 10^4$ до $4,58 \pm 0,79 \times 10^5$ КОЕ/мл. Повышение скорости вращения до 20 000 об/мин существенно не повышало эффективность осаждения бактериальных клеток: остаточный титр супернатанта составил $2,81 \pm 0,89 \times 10^4$ КОЕ/мл. Скорость подачи культуральной жидкости в центрифугу подбирали при оптимальной скорости вращения ротора. Лучшие результаты были показаны при подаче 500 ± 50 мл/мин. При повышении скорости подачи снижалась эффективность осаждения биомассы. Остаточный титр составил от $5,35 \pm 0,56 \times 10^4$ до $7,23 \pm 0,26 \times 10^5$ (рис. 1, 2).



Рисунок 1 – Зависимость остаточного титра бактерий в супернатанте от скорости вращения ротора центрифуги (при постоянной подаче)

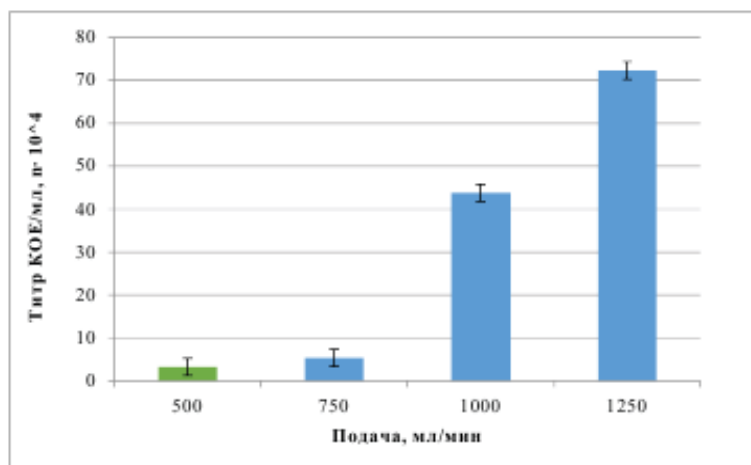


Рисунок 2 – Зависимость остаточного титра бактерий в супернатанте от скорости подачи бактериальной суспензии в центрифугу (при оптимальной скорости вращения ротора центрифуги)

Таким образом, оптимальные параметры для фракционирования культуральных жидкостей бактерий рода *Bacillus* составили $18\,000 \pm 500$ об/мин – скорость вращения ротора при скорости подачи 500 ± 50 мл/мин. Также было проведено сравнение антагонистической и ферментативных активностей полученного супернатанта и изначальной культуральной жидкости (табл.).

Таблица – Ферментативная и антагонистическая активность различных форм кормовой добавки

Форма кормовой добавки	Ферментативная активность, ед/мл				Антимикробная активность (мм) в отношении		
	α -амилолитическая	Протеолитическая	Целлюлолитическая	Ксиланазная	<i>E. coli</i> 39A	<i>S. aureus</i> 1528	<i>S. dublin</i> 3
Культуральная жидкость	0,46	9,66	0,58	3,94	$27,3 \pm 0,2$	$32,3 \pm 0,5$	$20,3 \pm 0,3$
Супернатант	0,38	8,94	0,49	3,44	$27,0 \pm 0,2$	$32,2 \pm 0,3$	$14,1 \pm 0,2$
Сухая	1,37	12,25	1,77	5,24	$20,8 \pm 0,3$	$22,2 \pm 0,2$	$16,7 \pm 0,2$

Показано, что значительной разницы в исследуемых показателях не наблюдается, из чего можно сделать вывод о возможности использования проточной центрифуги для фракционирования культуральной жидкости при скорости вращения ротора $18\,000 \pm 500$ об/мин и скорости подачи 500 ± 50 мл/мин. Допускается использование полученного таким образом супернатанта в дальнейшем как жидкой формы кормовой добавки без потери ей полезных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петрова И.С., Винцюнайте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения. – Прикл. биохимия и микробиология, 1966. – Т. 2, № 1. – С. 322–327.
2. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
3. Козлов А.Ю., Мхитарян В.С., Шишов В.Ф. Статистический анализ данных в MS Excel. – М.: Инфра-М, 2021. – 320 с.