



УДК 579.64:663.18+636.085.7

## Новый высокопродуктивный штамм *Propionibacterium acidipropionici* FL-48 с повышенной устойчивостью к пропионовой кислоте и масштабирование технологии его наработки в промышленных биореакторах

М.А. Карташов<sup>1</sup>, Т.М. Воинова<sup>1</sup>, А.В. Сергеева<sup>1</sup>, Н.В. Стацюк<sup>1</sup>,  
С.В. Роговский<sup>1</sup>, Я.О. Гребенева<sup>1</sup>, Д.А. Дурникин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «Фермлаб», Москва, Россия, <sup>2</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Пропионовокислые бактерии, в том числе *Propionibacterium acidipropionici*, широко используются в химической промышленности для получения пропионовой кислоты, а также для консервирования пищи и заготовки зерна и зеленых кормов. Однако эффективность промышленного производства биомассы пропионовокислых бактерий ограничена их чувствительностью к высоким концентрациям в среде пропионовой кислоты. Таким образом, актуальной задачей является разработка новых биотехнологических процессов и штаммов, позволяющих преодолеть это ограничение и повысить рентабельность микробиологического производства. Методом двухступенчатого индуцированного мутагенеза с применением УФ-облучения и диэтилсульфата получен новый мутантный штамм *P. acidipropionici* ФЛ-48, обладающий повышенной резистентностью к 10 г/л пропионовой кислоты (количество жизнеспособных клеток через 24 ч культивирования достигало  $1,05 \times 10^6$ ) и превосходящий родительский штамм *P. acidipropionici* ВКПМ В-5723 по скорости накопления биомассы и количеству продуцируемых пропионовой и уксусной кислот на 35%, 20% и 16%, соответственно. Стабильность характеристик нового штамма (скорость накопления биомассы и жизнеспособность на средах с повышенной концентрацией пропионовой кислоты) подтверждена трехкратным последовательным моноклональным расщеплением на среду, содержащую 10 г/л пропионовой кислоты. Выполненная оптимизация технологии культивирования штамма позволила определить оптимальную дозу инокулюма для засева биореактора (10% от объема ферментационной среды) и поддерживаемый в течение первых 12 ч уровень рН среды, обеспечивающий максимальный прирост биомассы ( $6,1 \pm 0,1$ ). Проведенное масштабирование ферментации до 100-литрового биореактора с соблюдением оптимальных условий культивирования показало сохранение высокой скорости роста штамма в условиях пониженного рН; уже к 20-му часу ферментации количество жизнеспособных клеток в культуральной жидкости превышало  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. Полученные результаты показали хорошую воспроизводимость. Новый штамм представляет интерес в качестве компонента биоконсервантов для силоса и сенажа, а также может быть использован в качестве эффективного продуцента пропионовой кислоты.

**Ключевые слова:** пропионовая кислота; биоконсерванты; накопление биомассы; индуцированный мутагенез; масштабирование

## A new highly productive *Propionibacterium acidipropionici* FL-48 strain with increased resistance to propionic acid and the scaling up of its production for industrial bioreactors

M.A. Kartashov<sup>1</sup>, T.M. Voinova<sup>1</sup>, A.V. Sergeeva<sup>1</sup>, N.V. Statsyuk<sup>1</sup>,  
S.V. Rogovsky<sup>1</sup>, Y.O. Grebeneva<sup>1</sup>, D.A. Durnikin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FermLab LLC, Moscow, Russia, <sup>2</sup>Altai State University, Barnaul, Russia

Propionic acid bacteria, including *Propionibacterium acidipropionici*, are widely used in the chemical industry to produce propionic acid and also for food and feed preservation. However, the efficiency of the industrial production of these bacteria is limited by their sensitivity to

ООО «Фермлаб», Неманский пр., 18, Москва, 123592, Россия

Fermlab LLC, Nemansky Ave., 18, Moscow, 123592, Russia

Tel.: +7-903-502-48-57. Email: fermlab@mail.ru

Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия

Altai State University, Lenin Ave., 61, Barnaul, 656049, Russia

Tel. +7-913-225-38-38. Email: durnikin@list.ru

high concentrations of propionic acid excreted into the cultivation medium. Therefore, the development of new biotechnological processes and strains able to overcome this limitation and to improve the profitability of the microbiological production remains a relevant problem. A new *P. acidipropionici* FL-48 strain characterized by an increased resistance to 10 g/L of propionic acid (the number of viable cells after 24-h cultivation reached  $1.05 \times 10^6$ ) was developed by a two-step induced mutagenesis using UV and diethyl sulphate from the *P. acidipropionici* VKPM B-5723 strain. The mutant strain exceeded the parental strain in the biomass accumulation rate and the amount of produced propionic and acetic acids by 35%, 20%, and 16%, respectively. The stability of such important characteristics as the biomass accumulation rate and the viability on media containing heightened concentrations of propionic acid was confirmed by three sequential monoclonal subculturings on a medium supplemented with 10 g/L of propionic acid. The optimization of the cultivation technology made it possible to determine the optimum seed inoculum dose (10% of the fermentation medium volume) and the best pH level for the active growth stage ( $6.1 \pm 0.1$ ). The scaling up of the fermentation to a 100-L bioreactor under observance of optimum cultivation conditions demonstrated a high biomass growth rate with a sufficient reproducibility; after 20 h of fermentation, the number of viable cells in the culture broth exceeded  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL. The new strain could be interesting as the component of silage and haylage biopreservatives and also could be used as an efficient producer of propionic acid.

*Keywords:* propionic acid; biopreservatives; biomass accumulation; induced mutagenesis; scaling up

## Введение

Эффективное развитие животноводства невозможно без использования высококачественного силоса и сенажа. Силосование (ферментация) – биологический процесс, результат которого зависит от многих факторов, оказывающих существенное влияние на показатели питательности и безопасности корма. Во многих регионах рискованного земледелия силос является основным сочным кормом для крупного рогатого скота в зимний период; его удельный вес по питательности в рационах может превышать 50% (Levakhin et al., 2012).

Технология заготовки силоса как способа сохранения сочных кормов известна уже более тысячи лет назад. Качество и скорость его созревания зависят от того, какая микрофлора преобладает на поверхности зеленой массы. Одним из существенных недостатков заготовки такого вида корма являются значительные потери питательных веществ исходного сырья в процессе силосования, вызванные присутствием гнилостных бактерий, плесневых и дрожжевых грибов, а также других нежелательных микроорганизмов и достигающие порой 25–30% (Levakhin et al., 2012). Полностью избежать этих потерь невозможно, но их можно значительно сократить за счет применения различных консервантов химического и биологического происхождения (Dolezal et al., 2008; Jones and Morse, 2013; Kim et al., 2015).

Применение химических препаратов имеет ряд существенных недостатков: полученный силос не является экологически чистым, может содержать токсичные и дурно пахнущие компоненты, а сами применяемые химические препараты химически агрессивны и небезопасны для работающего персонала (Valpanov et al., 2014). Альтернативой химическому методу могут служить биоконсерванты, способные не только сохранять в силосе питательные вещества, но и ускорять в нем процессы ферментации. В качестве таких агентов, как правило, применяются молочнокислые бактерии (МКБ). При биологическом консервировании силоса МКБ перерабатывают водорастворимые углеводы растений в молочную кислоту, причем потери энергии в ходе этого процесса составляют всего 3–5%, что повышает питательную ценность силоса. При этом выделяющиеся метаболиты МКБ подавляют деятельность гнилостных и маслянокислых бактерий и плесневых грибов (Whiter and Kung, 2001; Kung and Ranjit, 2001). Однако МКБ оказываются не в состоянии подавить развитие дрожже-

вых и плесневых грибов в аэробных условиях (после вскрытия силосных ям), что снижает аэробную стабильность силоса после начала его использования (Агагун, 2012). Решить эту проблему можно путем добавления в состав биоконсервантов пропионовокислых бактерий (ПКБ), таких как *Propionibacterium acidipropionici*, способных преобразовывать молочную кислоту и глюкозу в уксусную и пропионовую кислоты и обладающих более выраженным противомикробным эффектом, чем молочная кислота, в аэробных условиях (Tomes, 1991; Benfeldt and Morgenstern, 2015).

Добавление пропионовокислых бактерий в консерванты для силосования приводит к улучшению аэробной стабильности силоса и значительно снижает темпы порчи силоса нежелательными микроорганизмами в условиях прямого контакта с воздухом (Dawson et al., 1998; Filya et al., 2004, 2006). Кроме того, ПКБ обладают мощными иммуномодулирующими и антимуtagenными свойствами и способны снижать генотоксичный эффект ряда химических соединений и УФ-облучения, а вырабатываемая ими пропионовая кислота (ПК) находит широкое применение в различных областях народного хозяйства (Liu et al., 2012).

Биосинтез ПК относится к процессам, ингибируемым накапливаемым продуктом (Nanba et al., 1983), а промышленное производство биомассы пропионовокислых бактерий, в частности, *P. acidipropionici*, методами глубинного культивирования характеризуется не очень высокой концентрацией клеток бактерий в культуральной жидкости (Vorobyeva, 1998). В то же время высокий спрос на штаммы ПКБ, используемые для консервирования пищи и при заготовке зерна и кормов, стимулирует поиск новых улучшенных штаммов и развитие новых ферментационных процессов с целью увеличения выхода биомассы и создания рентабельного производства (Hsu and Yang, 1991; Quesada-Chanto et al., 1994; Coral et al., 2008). Таким образом, разработка нового улучшенного штамма *P. acidipropionici* со сниженной чувствительностью к ПК и эффективной технологии его культивирования представляется важной и актуальной задачей.

Цель данной работы – разработка нового промышленного штамма *P. acidipropionici*, отличающегося повышенным накоплением биомассы в присутствии высоких концентраций ПК, а также оптимизация и масштабирование условий его культивирования в биореакторах.

## Материал и методы исследований

### Объект исследования и среды культивирования.

В качестве объекта исследования использован штамм *P. acidipropionici* ВКПМ В-5723, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Москва, Россия) и характеризуемый относительно невысокой устойчивостью к повышенным концентрациям ПК (при расसेве на агаризованную бифидум-среду, содержащую 5 и 10 г/л ПК, выживаемость исходного штамма составляла 5,1% и 0,03%, соответственно).

Для выращивания и поддержания штамма использовали бифидум-среду M1395 (HiMedia, Индия).

При проведении мутагенеза использовали агаризованную бифидум-среду, а также посевную и ферментационную среды следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 10, бульон соевого триптона – 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,5 (рН 7,0). Кроме того, в ферментационную среду дополнительно вносили глицерин (20 г/л) и  $\text{CoCl}_2$  (0,01 г/л). Культивирование в ферментерах проводили с использованием посевной и ферментационной сред следующего состава (г/л): меласса – 10, лактоза – 0,5, кукурузный экстракт – 20 мл/л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2, лапрол – 0,2; рН до стерилизации –  $7,3 \pm 0,1$ .

**Мутагенез.** На первой ступени мутагенеза использовали УФ-облучение с длиной волны 254 нм (лампа Mineralight, мощностью 30 Вт). Для этого 1 мл клеточной суспензии в 0,9% растворе хлорида натрия ( $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл) вносили в 9 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 6,0), тщательно перемешивали и помещали в стерильные чашки Петри. Чашки помещали под УФ-излучатель (на расстоянии 30 см от него) и экспонировали в течение 2–3 минут. Степень выживаемости колоний определяли по соотношению колоний, выросших на облученных и контрольных чашках. Выросшие изолированные колонии пересеивали на агаризованную бифидум-среду, культивировали в течение 48 ч в стационарных условиях, после чего готовили клеточную суспензию в 0,9% растворе хлорида натрия ( $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл).

На второй ступени проводили мутагенез с использованием диэтилсульфата (DES). Для этого 0,2 мл DES добавляли в пробирку с 16 мл стерильного 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0). Затем в эту же пробирку вносили 4 мл суспензии клеток, выросших на бифидум-среде после первой ступени мутагенеза, и инкубировали 30 минут. Затем клетки дважды отмывали в фосфатном буфере и переносили в посевную среду, дополнительно содержащую ПК в концентрации 5 г/л. После инкубирования посевной культуры в течение 24 ч посевную среду переносили в ферментационную среду. Далее культуру инкубировали при 30 °С в течение 48 ч, после чего определяли основные физиологические и биохимические параметры культуры.

**Условия культивирования.** Для оценки полученных мутантных штаммов посевной материал выращивали с использованием посевной среды в течение 24 ч на ротационной качалке при 220–240 об./мин и температуре  $30 \pm 1$  °С, после чего засеивали 100 мл ферментационной среды (объем посевного материала составлял 10% от объема ферментационной среды) и выращивали в колбах Эрленмейера, объемом 750 мл в течение 24 ч при  $30 \pm 1$  °С и 200 об./мин.

Эксперименты по оптимизации условий культивирования осуществляли на лабораторной установке Biotron (Biotron Inc., Южная Корея), состоящей из четырех одинаковых биореакторов, вместимостью 3 л. Параметры культивирования (обороты мешалки, поддержание рН, подача компонентов питания и др.) программировали и контролировали при помощи компьютера. Режим культивирования устанавливали следующий: температура –  $30 \pm 1$  °С без аэрации (воздух подавали только до создания избыточного давления в аппарате до  $P = 1,5$  бар), режим работы мешалки – 400 об./мин.

Масштабирование ферментации осуществляли в биореакторе емкостью 100 л (ООО «Профсплав», Россия). Нарработку биомассы пропионовокислых бактерий осуществляли при температуре  $30 \pm 1$  °С без аэрации (воздух подавали только до создания избыточного давления в аппарате до  $P = 1,5$  бар), режим работы мешалки – 200 об./мин. Инокулом для засева биореактора набавывали на установке Biotron (24 ч,  $30 \pm 1$  °С, рН –  $6,1 \pm 0,1$ ). Общий объем полученного инокулома составил 7 литров, общий объем ферментационной среды в биореакторе – 70 литров.

**Аналитические методы.** Количество жизнеспособных клеток определяли методом разведений по Пастеру с последующим высевом на агаризованную бифидум-среду (Netrusov and Egorova, 2005). Для контроля физиологического состояния культуры готовили фиксированный мазок (Netrusov and Egorova, 2005) и исследовали его на фазовом контрасте с использованием микроскопа Olympus BX41 с объективом  $\times 100$  и масляной иммерсией. Сухой вес бактериальных клеток в суспензии определяли после высушивания пробы в сушильном шкафу при 105 °С до постоянного веса. Определение содержания органических кислот в культуральной жидкости осуществляли в соответствии с известными методиками (Sheveleva and Ramenskaya, 2010). Активную кислотность (рН) питательных сред и культуральной жидкости определяли потенциометрическим способом при помощи рН-метра (культивирование в колбах/флаконах) или стерилизуемого рН-датчика (культивирование в ферментере).

**Статистическую обработку** полученных результатов осуществляли путем расчета относительной дисперсии воспроизводимости и доверительного интервала среднего значения с использованием программы Statistica 6.0 (Borovikov, 2003).

## Результаты и их обсуждение

**Мутагенез.** При переходе на крупномасштабное культивирование *P. acidipropionici* вопрос об устойчивости промышленных штаммов к органическим кислотам становится весьма актуальным (Zhu, 2010). Способом решения данной проблемы был выбран двухступенчатый индуцированный мутагенез, сочетающий воздействие физического и химического мутагенных факторов. Этот метод достаточно широко применяется для получения штаммов микроорганизмов, обладающих новыми свойствами (Zhang et al., 2013; Korniłowicz-Kowalska and Rybczyńska, 2014; Zhang et al., 2016). В литературе (Ganicheva, 1992) упоминается пример успешного про-

ведения такого мутагенеза у *P. acidipropionici* с использованием N-нитрозо-N-метилбиурета (НМБ) и УФ-облучения с целью получения мутантных штаммов, синтезирующих увеличенное количество витамина В<sub>12</sub>. В соответствии с результатами этого исследования, такая комбинация мутагенных факторов позволила существенно повысить эффект мутагенеза и увеличить число полученных высокопродуктивных мутантов.

Согласно результатам нашего исследования, использование дополнительного мутагенного фактора привело к пятикратному повышению частоты возникновения мутаций по сравнению с одноступенчатым мутагенезом, достигнув уровня  $1 \cdot 10^{-3}$ . Высев отобранных на второй ступени перспективных клонов на среду с добавлением ПК в концентрации 5 и 10 г/л обеспечил возможность селективного отбора резистентных к ПК штаммов. В результате была отобрана группа из шести мутантных штаммов, морфологически отличающихся от колоний исходного штамма и характеризующихся сохранением достаточно высокого количества жизнеспособных клеток при культивировании на среде, содержащей ПК. Полученная группа штаммов проанализирована по параметру скорости роста клеток, то есть способности штамма накапливать за короткое время максимальную биомассу. Для определения быстрорастущих вариантов штаммы культивировали на средах для мутагенеза при 30 °С в течение 24 ч, после чего определяли сухой вес клеточной биомассы (табл. 1).

Таблица 1

**Накопление биомассы исходным и мутантными штаммами *Propionibacterium acidipropionici* ( $\bar{x} \pm SE$ , n = 8)**

Индекс штамма	Сухой вес биомассы, г/л
ВКПМ В-5723 (контроль)	0,47 ± 0,011
ФЛ-2	0,33 ± 0,012
ФЛ-7	0,71 ± 0,014
ФЛ-48	1,48 ± 0,022
ФЛ-123	1,35 ± 0,010
ФЛ-178	0,84 ± 0,014
ФЛ-179	1,19 ± 0,038

По результатам опыта максимальное накопление биомассы отмечено для штамма *P. acidipropionici* ФЛ-48. Результаты оценки жизнеспособности данного штамма при культивировании на агаризованной бифидум-среде с добавлением ПК приведены в таблице 2.

Таблица 2

**Оценка жизнеспособности штамма *Propionibacterium acidipropionici* ФЛ-48 при культивировании на среде с добавлением пропионовой кислоты ( $\bar{x} \pm SE$ , n = 12)**

Концентрация пропионовой кислоты в агаризованной бифидум-среде, г/л	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл
0 (контроль)	$(4,02 \pm 0,96) \times 10^9$
5	$(2,03 \pm 0,63) \times 10^8$
10	$(1,05 \pm 0,93) \times 10^6$

**Характеристики штамма *P. acidipropionici* ФЛ-48.**

На агаризованной бифидум-среде новый штамм образовывал округлые колонии размером до 1,3 мм, с неровными краями, маслянистые, влажные, светло-кремового и кремового цвета. Результаты сравнения морфологиче-

ских характеристик исходного и мутантного штаммов, выращенных на агаризованной среде, приведены в таблице 3. Сравнение биохимических характеристик показало, что штамм ФЛ-48 сохранил способность сбраживать сахарозу, мальтозу, лактат и восстанавливать нитраты.

Таблица 3

**Морфологические характеристики штаммов *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723 и ФЛ-48**

Показатель	ВКПМ В-5723	ФЛ-48
Локализация колоний	в толще питательной среды	как в толще питательной среды, так и на ее поверхности
Форма колоний	округлые	округлые с неровными краями
Цвет колоний	белый	светло-кремовый и кремовый
Размер колоний, мм*	0,8–1,2	1,1–1,4
Рост в аэробных условиях	слабый	хороший

Примечание: \* – через 24 ч культивирования.

Для подтверждения успешности мутации и стабильности нового штамма штамм ФЛ-48 трижды провели через моноклональный рассев с высевом на питательную среду, содержащую 10 г/л ПК. Каждый раз для следующего посева отбирали по 10–20 колоний с поверхности агара, с параметрами, характерными для мутанта ФЛ-48. Результаты эксперимента подтвердили стабильность штамма по скорости накопления биомассы и жизнеспособности на средах с повышенной концентрацией ПК.

**Сравнение биотехнологических свойств штаммов *P. acidipropionici* ВКПМ В-5723 и ФЛ-48.**

Сравнительную оценку биотехнологических свойств мутантного штамма ФЛ-48 и исходного штамма ВКПМ В-5723 проводили в лабораторных условиях на установке Biotron. В качестве анализируемых параметров использовали ключевые параметры отбора – накопление биомассы бактерий и способность к синтезу пропионата. При определении параметров культивирования исходили из имеющихся в литературе данных о том, что оптимальные для биосинтеза пропионата значения температуры и кислотности среды (рН) составляют 30 °С и 6,5, соответственно (Wang, 2015). Оптимальное значение рН для роста пропионовокислых бактерий находится в интервале 6,0–7,0 (Hsu, 1991). Кривые накопления клеток бактерий в культуральной жидкости при ферментации в контролируемых условиях (30 °С, рН 6,0) показаны на рисунке 1. Уже к 20 ч культивирования содержание жизнеспособных клеток в культуральной жидкости штамма ФЛ-48 достигло  $9,2 \times 10^9$  КОЕ/мл, в то время как аналогичное значение для родительского штамма составило  $6,8 \times 10^9$  КОЕ/мл. Таким образом, при культивировании в контролируемых условиях мутантный штамм отличается более высокой скоростью роста по сравнению с родительским штаммом, который достигает такого же количества жизнеспособных клеток в среде, только к 28–30 часам роста (данные не приведены).

Другим важным показателем, характеризующим штаммы пропионовокислых бактерий, является их способность продуцировать пропионовую и уксусную ки-

слоту. На рисунке 2 показаны уровни накопления упомянутых органических кислот по истечении 24 ч культивирования родительского и мутантного штаммов. Согласно полученным данным, уровень продукции пропионовой и уксусной кислот мутантным штаммом ФЛ-48 превосходит таковой родительского штамма на 20% и 16%, соответственно.

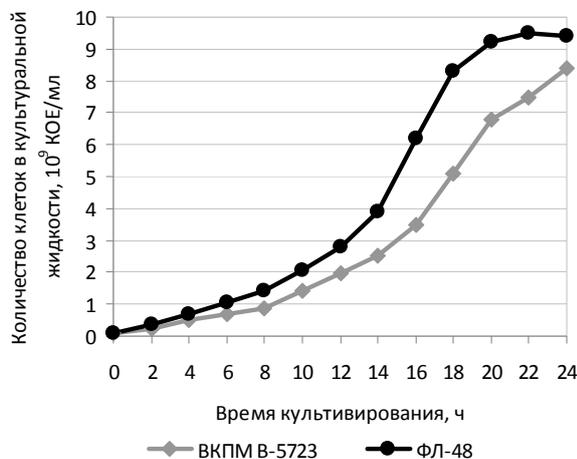


Рис. 1. Динамика роста штаммов *Propionibacterium acidipropionici* VKPM B-5723 и ФЛ-48 в лабораторном ферментере объемом 3 л в контролируемых условиях (30 °С, рН 6,0)

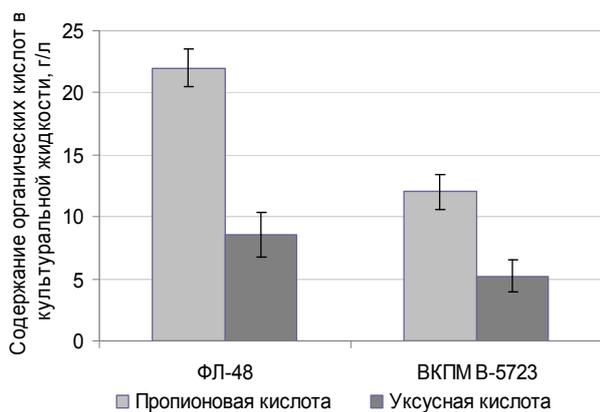


Рис. 2. Синтез пропионовой и уксусной кислот штаммами *Propionibacterium acidipropionici* VKPM B-5723 и ФЛ-48 (рН среды – 6,0)

Таким образом, по своим биотехнологическим свойствам мутантный штамм ФЛ-48 существенно превосходит исходный штамм VKPM B-5723.

**Оптимизация методики культивирования штамма *P. acidipropionici* ФЛ-48.** Проблема улучшения промышленных штаммов пропионовокислых бактерий и совершенствования методов их промышленного культивирования широко изучается во всем мире (Liu et al., 2012). Большинство публикаций, связанных с оптимизацией и масштабированием процесса ферментации *P. acidipropionici*, посвящено технологиям направленного биосинтеза пропионовой кислоты (Coral et al., 2008; Zhu et al., 2010; Stowers et al., 2014). Однако в нашем случае в качестве наиболее важного биотехнологического параметра определено максимальное накопление биомассы клеток, причем в максимально короткий промежуток времени.

Важным параметром, влияющим на длительность ферментации и конечную плотность клеток, является доза посевного материала. Результаты исследования влияния дозы инокулята на уровень накопления биомассы в культуральной жидкости представлены на рисунке 3 и являются усреднением четырех проведенных ферментаций.

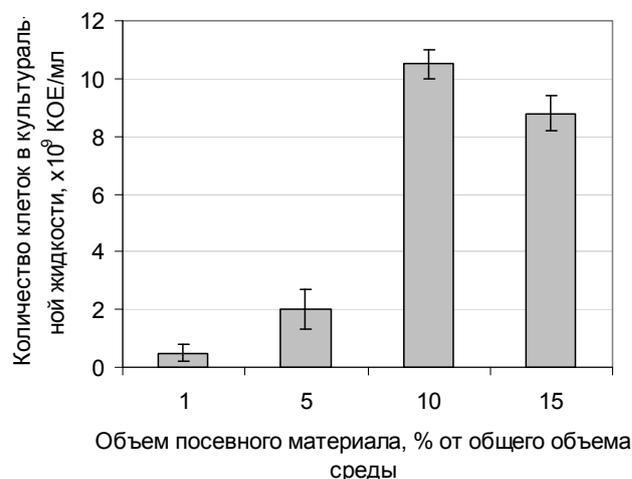


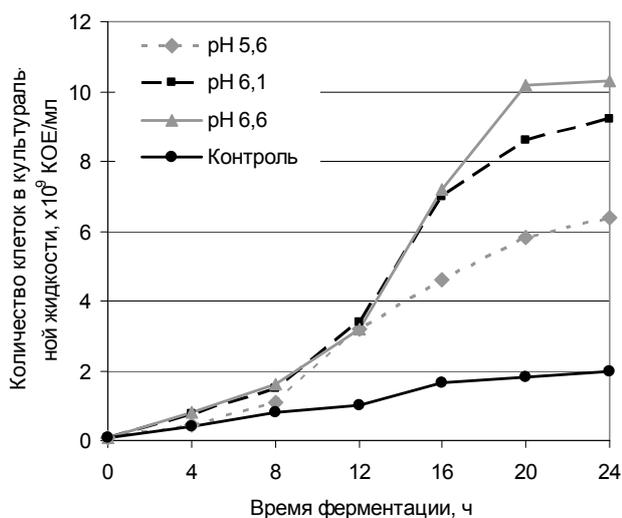
Рис. 3. Влияние дозы инокулята на накопление биомассы штамма *Propionibacterium acidipropionici* ФЛ-48 в культуральной жидкости

По мере увеличения дозы инокулята в посевном аппарате с 1% до 10% количество жизнеспособных пропионовокислых бактерий в культуральной жидкости резко возрастает, достигая значения  $1,05 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. Дальнейшее повышение дозы инокулята уже не обеспечивает прироста. Это связано с тем, что клетки, попав в богатую питательными веществами среду, начинают размножаться с максимальной для данной культуры скоростью. Чем выше начальная концентрация клеток, тем меньше времени им требуется для активации необходимых ферментных систем (Wang et al., 2015). Таким образом, оптимальная посевная доза штамма ФЛ-48, обеспечивающая максимальное наращивание биомассы мутантного штамма, составила 10%.

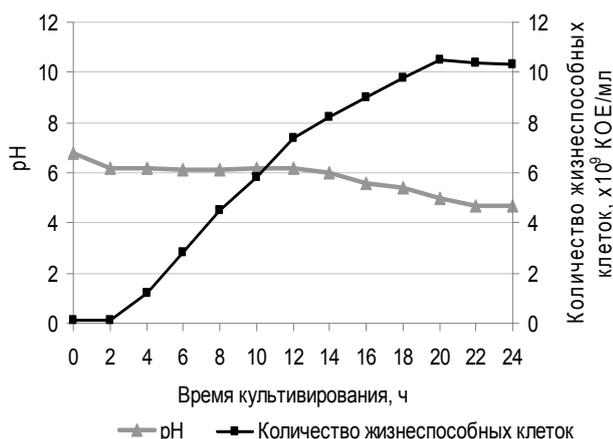
Образующиеся в процессе культивирования ПБК органические кислоты снижают рН культуральной среды и тем самым угнетают рост клеточной массы бактерий (Vogobueva, 1998; Liu et al., 2012). Следовательно, необходимо уточнить оптимальное значение рН среды для культивирования полученного мутантного штамма ФЛ-48 в контролируемых условиях. Ферментационную среду с исходным значением рН  $6,9 \pm 0,1$  засеивали инокулятом в объеме 10%. В момент начала ферментации включали автоматическую систему контроля рН. Поддержание рН ферментационной среды осуществляли путем подачи в биореактор 20% раствора NaOH. Протестировано четыре варианта опыта. В первых трех вариантах рН среды на протяжении первых 12 ч культивирования (фаза активного роста) поддерживали на уровне  $5,6 \pm 0,1$ ,  $6,1 \pm 0,1$  и  $6,6 \pm 0,1$ , соответственно. В четвертом варианте опыта рН среды не регулировали. Каждые 4 ч из биореактора отбирали пробы, в которых определяли количество жизнеспособных клеток (рис. 4). К концу периода контролируемой поддержки уровня рН наибольшее количество жизнеспособных

собных клеток ( $3,4 \times 10^9$  КОЕ/мл) выявлено для варианта, в котором pH поддерживали на уровне  $6,1 \pm 0,1$ .

**Масштабирование процесса ферментации штамма ФЛ-48.** Конечной целью данного исследования являлась разработка методики производства полученного мутантного штамма в промышленных масштабах, поскольку упомянутый штамм предполагалось включить в состав разрабатываемого комплексного биоконсерванта для силосования кормов, представляющего собой смесь лиофилизированных оригинальных мутантных штаммов видов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum* и *P. acidipropionici* в комбинации с защитной средой и наполнителем (общее содержание молочнокислых и пропионовокислых бактерий в сухом препарате – не менее  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/г).



**Рис. 4. Накопление жизнеспособных клеток штамма *Propionibacterium acidipropionici* ФЛ-48 при различном pH среды**



**Рис. 5. Динамика накопления жизнеспособных клеток штамма *Propionibacterium acidipropionici* ФЛ-48 при культивировании в биореакторе, объемом 100 л**

Для масштабирования производства мутантного штамма ФЛ-48 ферментацию проводили в 100-литровом биореакторе. После засева посевным инокуломом (в объеме 10% от объема ферментационной среды) штамм культивировали в контролируемых условиях, включая поддержку pH на уровне  $6,1 \pm 0,1$  в течение первых 12 ч.

Начиная с 12 ч культивирования, из биореактора отбирали пробы, в которых определяли сохранность жизнеспособных клеток штамма. Усредненные результаты пяти ферментаций показаны на рисунке 5. Максимальное количество жизнеспособных клеток в питательной среде ( $1,05 \times 10^{10}$  КОЕ/мл) достигнуто к 20–22 ч ферментации. Указанное количество обеспечивает возможность получения лиофилизированной массы клеток, достаточной для производства вышеупомянутого комбинированного биоконсерванта.

Наработанная в ходе исследования биомасса пропионовокислых бактерий использована для приготовления опытной партии вышеупомянутого биологического консерванта. Проведенные производственные испытания биоконсерванта, включавшие подбор оптимальной дозировки для заготовки силоса и оценку эффективности скармливания этого силоса лактирующим коровам, показали положительный эффект от его применения (Baryshnikov et al., 2016).

## Выводы

В результате исследования получен новый мутантный штамм *P. acidipropionici*, обладающий хорошей резистентностью к 10 г/л пропионовой кислоты. Отмеченное улучшение биотехнологических свойств (увеличение скорости роста и количества продуцируемых органических кислот) по сравнению с родительским штаммом ВКПМ В-5723, очевидно, является следствием увеличенной резистентности бактериальной клетки к повреждающему воздействию накапливающихся в питательной среде в процессе культивирования органических кислот. Проведено масштабирование ферментации от 3-литрового до 100-литрового биореактора с сохранением высокой скорости прироста биомассы в условиях пониженного pH (6,1). Уже к 20–22 ч ферментации количество жизнеспособных клеток в культуральной жидкости превышало  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. Воспроизводимость полученных результатов оказалась на хорошем уровне. Полученный штамм представляет интерес в качестве компонента биоконсервантов для силоса и сенажа, а также может быть использован в качестве эффективного продуцента пропионовой кислоты.

## 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 № 14.579.21.0107 от 15.10.2015 г., RFMEF157915X0107).

## Библиографические ссылки

- Aragyn, Y.K., 2012. The use of probiotic strains as silage inoculants. In: Rigobelo, E.C. (ed.). Probiotic in animals. Intech, Rijeka, Croatia.
- Balpanov, D.S., Ten, O.A., Esepbay, G.E., Barbasova, S.K., 2014. Tehnologiya polucheniya zakvaski dlya silosovaniya grubostebel'chatykh kormov s ispolzovaniem molochnokis-

- lykh i propionovokislykh kul'tur [Technology of a starter production for the preparation of crude feed using lactic acid and propionic acid bacteria]. *Biotechnologiya. Teoriya i Praktika* 1, 79–84 (in Russian).
- Baryshnikov, P.I., Khaustov, V.N., Burtseva, S.V., Nekrasov, R.V., Chabaev, M.G., Zelenchenkova, A.A., Dumikin, D.A., 2016. Povyshenie kachestva kormov i molochnoi produktivnosti korov pri ispol'zovanii novogo biologicheskogo konservanta v liofilizirovannoi forme [Improvement of the silage quality and milk productivity of cattle by the use of a new lyophilized biological preservative]. *Biological Bulletin of Bogdan Chmel'nytskiy Melitopol State Pedagogical University* 6(2), 277–286 (in Russian).
- Benfeldt, C., Morgenstern, H.U., 2015. Strains of *Propionibacterium*. US Patent Application no. 2015/0150298.
- Borovikov, V.P., 2003. *Statistica. Iskustvo analiza dannyh na komp'yutere* [Statistica. The art of a computer data analysis]. 2nd edition. Piter, Saint Petersburg (in Russian).
- Coral, J., Karp, S.G., Porto de Souza Vandenberghe, L., Parada, J.L., Pandey, A., Soccol, C.R., 2008. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 333–341.
- Dawson, E., Rust, R.S., Yokoyama, M.T., 1998. Improved fermentation and aerobic stability of ensiled, high moisture corn with the use of *Propionibacterium acidipropionici*. *J. Dairy Sci.* 81, 1015–1021.
- Dolezal, L., Zeman, J., Skladanka, J., 2008. Effect of supplementation of chemical preservative on fermentation process of lupine silage. *Slovak J. Anim. Sci.* 41(1), 30–38.
- Filya, I., Sucu, E., Karabulut, A., 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97(4), 818–826.
- Filya, I., Sucu, E., Karabulut, A., 2006. The effects of *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus plantarum*, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(5), 353–358.
- Ganicheva, T.V., 1992. *Mutagenez propionovokislykh bakterii – produtsentov vitamina B<sub>12</sub>* [Mutagenesis of propionic acid bacteria producing vitamin B<sub>12</sub>]. Moscow (in Russian).
- Hsu, S.-T., Yang, S.-T., 1991. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: Effects of pH. *Biotechnol. Bioeng.* 38(6), 571–578.
- Kim, D.H., Amanullah, S.M., Lee, H.J., Joo, Y.H., Kim, S.C., 2015. Effect of microbial and chemical combo additives on nutritive value and fermentation characteristic of whole crop barley silage. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 28(9), 1274–1280.
- Korniłowicz-Kowalska, T., Rybczyńska, K., 2014. Anthraquinone dyes decolorization capacity of anamorphic *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 strain and its HRP-like negative mutants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30(6), 1725–1736.
- Kung, L. Jr., Ranjit, N.K., 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.* 84(5), 1149–1155.
- Levakhin, V.I., Poberukhin, M.M., Sirazetdinov, R.F., Babicheva, I.A., 2012. Vliyanie silosa, zagotovlennogo s biokonservantami, na perevarimost' pitatel'nykh veshchestv ratsionov i obmen energii v organizme zhivotnykh [Effect of silage prepared with the use of biopreservatives on the digestibility of nutrients and energy exchange in the animal organism]. *Izvestiya Orenburgskogo GAU* 33(1), 244–246 (in Russian).
- Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G., Chen, J., 2012. Microbial production of propionic acid from *Propionibacterium*: current state, challenges and perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32(4), 374–381.
- Nanba, B.A., Nucada, R., Nagai, S., 1983. Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*. *J. Ferm. Technol.* 61, 551–556.
- Netrusov, A.I., Egorova, M.A., 2005. *Praktikum po mikrobiologii* [Practical training in microbiology]. Akademiya, Moscow (in Russian).
- Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S., Wagner, F., 1994. Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 16–21.
- Sheveleva, M.A., Ramenskaya, G.V., 2010. Gazokhromatograficheskiy analiz korotkotsepochnykh zhirnykh kislot v standartizatsii lekarstvennykh preparatov na osnove bakterial'nykh substansiy [Gas chromatography analysis of short-chain fatty acids for standardization of drugs based on bacterial substrates]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 44(6), 50–52 (in Russian).
- Stowers, C.C., Cox, B.M., Rodriguez, B.A., 2014. Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41(5), 837–852.
- Tomes, N.J., 1991. Bacterial treatment to preserve silage. US Patent no. 4981705.
- Vorobyeva, L.I., 1998. *Propionovokislye bakterii* [Propionic acid bacteria]. Izd. Moskovskogo Universiteta, Moscow (in Russian).
- Wang, Z., Jin, Y., Yang, S.T., 2015. High cell density propionic acid fermentation with an acid tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol. Bioeng.* 112(3), 502–511.
- Whiter, A.G., Kung, L. Jr., 2001. The effect of a dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 84(10), 2195–2202.
- Zhang, C., Shen, H., Zhang, X., Yu, X., Wang, H., Xiao, S., Wang, J., Zhao, Z.K., 2016. Combined mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* for improved production of carotenoids and lipids. *Biotechnol. Lett.* 38(10), 1733–1738.
- Zhang, X., Zhang, R., Yang, T., Zhang, J., Xu, M., Li, H., Xu, Z., Rao, Z., 2013. Mutation breeding of acetoin high producing *Bacillus subtilis* blocked in 2,3-butanediol dehydrogenase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29(10), 1783–1789.
- Zhu, Y., Li, J., Tan, M., Liu, L., Jiang, L., Sun, J., Lee, P., Du, G., Chen, J., 2010. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Biores. Technol.* 101(22), 8902–8906.

Надійшла до редколегії 22.09.2016