

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИЙ В ГАЗОВИХРЕВОМ БИОРЕАКТОРЕ «БИОК»

Зайцев В.В.¹, к. вет. наук

Рамазанов Ю.А.²,

Дремач Г.Э.³, к. вет. наук, доцент

Зайцева А.В.³, аспирант

Сафроненко Л.В.⁴, к. техн. н.

Тункель В.С.¹, старший микробиолог

¹ УП «Витебская биофабрика» г. Витебск, Республика Беларусь

² ЗАО «Саяны» г. Новосибирск, Россия

³ УО «Витебская государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

⁴ РУП «Институт мясомолочной промышленности» г. Минск, Республика Беларусь

Аннотация. Авторами статьи приведены сведения об отработке параметров культивирования сальмонелл, эшерихий, пастерелл, лептоспир, рожистых и молочнокислых бактерий в газовихревом биореакторе. Показана возможность использования аппарата с целью создания новых биологических препаратов и бактериальных концентратов.

Ключевые слова: культивирование, газовихревой биореактор, сальмонеллы, эшерихии, пастереллы, лептоспиры, рожистые бактерии, молочно-кислые бактерии.

Актуальность проблемы. Условия культивирования и, следовательно, выход целевого продукта в значительной мере определяется конструкцией биореактора, создающего оптимальные условия для роста и накопления бактериальной культуры.

Закрученные течения однофазных и многофазных сред широко используют в различных отраслях современной техники. Закручивание потока связано с необходимостью интенсификации процессов тепломассопереноса в энергетических установках или аппаратах химических технологий [2, 3, 4, 7]. В закрученном потоке интенсификация процессов переноса импульса, теплоты и массы вызвана в основном двумя причинами: изменением величины и направления скорости (влияния через средние характеристики течения); влиянием массовых сил на течение у твердых ограничивающих поверхностей.

В биореакторе «Биок» перемешивание суспензии бактериальных клеток осуществляют путем создания в ней квазистационарного вращательного движения, генерируемого азрирующим газом, который подают в емкость над поверхностью суспензии клеток с одновременным его закручиванием в поток с полем скорости потенциального вихря на периферии емкости (зона I) и осевым противотоком в приосевой зоне (зона II); при этом перепад давления в потоке азрирующего газа между периферией и центром вихря поддерживают в пределах 10-2000 Па [5].

Благодаря такому закручиванию азрирующего газа за счет трения на границе раздела фаз и разницы давления между периферией и центром газового вихря обеспечивается движение суспензии клеток в виде вихревого кольца, вращающегося относительно оси емкости с одновременным нисходящим движением жидкости на периферии емкости (зона III) и восходящим - в приосевой зоне (зона IV). Азрирующий газ взаимодействует с суспензией клеток только через свободную поверхность последней, не смешиваясь с ней. В результате этого обеспечивается интенсификация межфазного массообмена за счет увеличения скорости движения азрирующего газа и равномерного перемешивания суспензии без застойных зон, снижение травмируемости клеток – за счет исключения при перемешивании зон с высоким

уровнем турбулентности, и стабилизация пенообразования - вследствие разрушающего действия газового вихря на пену. Энергия, необходимая для перемешивания суспензии клеток, подводится по всей поверхности жидкости, что позволяет реализовать режимы суспензионного культивирования любых культур, в том числе наиболее чувствительных к механическому воздействию [1, 6, 7].

Согласно данным И.Д. Воробьева с соавторами (1989), величина сульфатного числа в вихревом биореакторе зависит от объема заполнения, расхода воздуха над свободной поверхностью жидкой фазы и интенсивности газового вихря. Введение воздуха через пористое днище вихревого биореактора приводит к резкому (более чем в 10 раз) увеличению сульфатного числа [4].

Газовихревой биореактор позволяет начинать культивирование при минимальном значении (10-15%) и путем непрерывного добавления среды в процессе культивирования завершить его при максимальном заполнении (90%). Это свойство аппарата позволяет сократить, а в ряде случаев исключить линию биореакторов меньшего объема для запуска аппарата большего объема. Конструкция газовихревого аппарата проще, дешевле и менее энергоемка, чем традиционные конструкции с механической мешалкой.

Согласно полученным данным, в биореакторах «Биок» с газовихревым перемешиванием жидкости удельная мощность на перемешивание в 12-16 раз ниже, чем в биореакторах с мешалкой фирмы «Хемап» [2].

Задача исследования. Изучить возможность управляемого культивирования разных видов бактерий, используемых в производстве биологических препаратов и молочно-кислых продуктов питания.

Материал и методы исследования. Работу осуществляли на газо-вихревом биореакторе «Биок» емкостью 5 дм³. При проведении исследований использовали производственные штаммы: *Sal. gallinarum-pullorum* 24 КСТ, *P. multocida suis* № 877, *Er. rhusiopathiae* ВР-2, *E. coli* №115, *L. pomona* ВГНКИ-6, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* и *Lactobacillus acidophilus*.

Для выращивания бактерий использовали изготовленные нами питательные среды: для культивирования рожистых бактерий – производственную среду, полученную согласно заявки на изобретение № 20050681 (авторы Зайцев В.В., Дремач Г.Э.), лептоспир – модифицированную сывороточную среду (автор Зайцев В.В.), эшерихий, сальмонелл и пастерелл – накопительные среды на основе гидролизатов мяса, мясокостной муки и белков сыворотки крови (авторы Зайцев В.В., Дремач Г.Э., Зайцева А.В.), молочно-кислых бактерий – гидролизатно-молочные питательные среды, полученные по технологии РУП «Институт мясомолочной промышленности».

Модифицированную сывороточную среду стерилизовали путем фильтрации через мембранный фильтр патронного типа (0,22 мкм).

Питательные среды для культивирования эшерихий, сальмонелл и пастерелл, питательную основу для выращивания рожистых бактерий фасовали в стеклянные баллоны емкостью 5 дм³, укупоривали ватно-марлевыми пробками, оборудованными стеклянным сифоном и канюлями, и стерилизовали при температуре 116-118⁰С в течение 45 минут.

Перед культивированием бактерий в предварительно смонтированный и простерилизованный при температуре 132⁰С в течение 2 часов газовихревой биореактор помещали: 2 дм³ питательной среды, соответствующей рецептуры, 0,2 дм³ посевного материала определенной культуры.

Процесс культивирования лептоспир в баллонах, применяемый в настоящее время в УП «Витебская биофабрика», непроизводителен, трудоемок и не эффективен. Он неуправляем и осуществляется без контроля и регулирования технологических параметров (за исключением температуры). Многочисленные операции с бутылками (монтаж, фильтрование среды, посев культур, отбор проб, составление серии) нередко приводят к загрязнению препарата, его выбраковке. Установленные на предприятии реакторы имеют ряд существенных конструктивных недостатков и не обеспечивают стабильной стерильности и регулирования технологических параметров.

При проведенні запланованої роботи лептоспири засевали в баллон, що містить модифіковану сировоточну поживну середу, до вмісту 8 млн.м.к./см³. В течение 72 годин лептоспири вирощували в баллоні при температурі 28⁰С. Далі культуру поміщали в газовихревої біореактор і вирощували в течение 12 годин при температурі 28⁰С. Перемішування середу здійснювали шляхом створення в ній тривимірного руху типу «вертувального вихревого кільця» при 1200-1500 об/хв.

В процесі культивування лептоспир визначали морфологію, тривалість лаг-фази, експоненціальної фази, максимальну удільну швидкість росту, мінімальне час генерації.

Рожисті бактерії вирощували в течение 4 годин без перемішування. Враховуючи, що еризипелотрикси є мікроаерофілами, аерацію не проводили. Через 4 години зробили поверхню продувку культури повітрям в течение 3 хвилин в об'ємі 1 дм³/дм³. Ріст здійснювали в течение 10 годин. В процесі культивування враховували морфологію, загальну концентрацію збудителя і кількість життєспособних клітин. На протязі всього процесу культивування температуру підтримували автоматично в межах 37,0-37,5⁰С.

Пастерелли вирощували в течение 10 годин. Перші 3 години культивування здійснювали без аерації при обертанні активатора 1000 об/хв, при цьому обертання плаваючої шайби становило 35 об/хв. З 4 години ріст режим обертання активатора встановили 1200 об/хв (обертання шайби 40 об/хв). Через 4 години швидкість обертання активатора встановили 1500 об/хв (обертання шайби 48 об/хв). Вирощування мікроорганізмів здійснювали при температурі 37,5-38,0⁰С. В процесі культивування через 4, 6 і 10 годин проводили відбір проб культури для проведення мікроскопічного дослідження, визначення концентрації і рН культуральної середу.

Ешерихії культивували в течение 12 годин. Після засів встановили обертання активатора в біореакторі 2500 об/хв, подачу повітря поверхню способом в об'ємі 0,7-0,8 дм³/дм³/хв. Подачу повітря в апарат вимірювали ратометром. В цілях дослідження впливу фізико-хімічних параметрів на ріст ешерихій зробили культивування на окремих фазах ріст при обертанні активатора 2600, 2700, 2850 і 3000 об/хв. Через 7 годин ріст вирощування вели при обертанні активатора 2200-2500 об/хв. Через 10 годин ріст в культуральному середу додали 40%-ний розчин глюкози з розрахунку 10 см³/дм³. В процесі культивування через 4, 6, 8, 10 і 12 годин ріст проводили відбір культуральної рідини для визначення концентрації мікроорганізмів і рН.

Культуру *Sal. pullorum gallinarum* вирощували в течение 12 годин при обертанні активатора 1500 об/хв в течение 4 годин. Через 6,8 і 10 годин ріст додали 40%-ний розчин глюкози відповідно в об'ємі 5, 10 і 8 см³ на літр культуральної середу. З 6 до 10 години ріст режим роботи активатора становив 2000 об/хв, а з 10 до 12 годин – 1800 об/хв. Аерацію здійснювали комбіновано – поверхню і глибинними способами відповідно 1,2 дм³/дм³ і 0,6 дм³/дм³.

Процес культивування лактококків проводили при постійному перемішуванні (частота роботи активатора 1200-1400 об/хв або 27-36 об/хв шайби) при підтриманні робочої температури 30⁰С і рН в діапазоні 6,2-6,8 шляхом додання 40%-ного розчину гідроксиду натрію.

Лактобацилли вирощували при рН 5,63-6,15 при постійному перемішуванні (частота роботи активатора 600-1600 об/хв) і температурі 37⁰С.

Вирощування мікроорганізмів проводили без застосування пеніциліну.

Результати досліджень. В ході досліджень встановлено, що для культивування лептоспир в ферментері необхідно використовувати посівні культури збудителя в експоненціальної фазі ріст (72 години ріст).

Управляємо періодичне культивування лептоспир в ферментерах газовихревої типу забезпечує фізіологічно більш активне стан культур, збільшення максимальної швидкості ріст, мінімальне час генерації по

сравнению с традиционной технологией производства, интенсификацию процесса за счет уменьшения продолжительности выращивания лептоспир в 1,5 раза (с 168 часов до 128 часов). При этом наблюдали более высокое накопление клеток – $6,2 \times 10^8$ м.к./см³, по сравнению с традиционной технологией ($0,9 \times 10^8$ м.к./см³).

В процессе культивирования эшерихий в аппарате «Биок» установили, что через 4 часа роста в культуральной среде содержалось 12 млрд.м.к/см³, рН – 7,2. Через 6, 8, 10 и 12 часов роста содержание клеток соответственно составило 15, 20, 23 и 25. При этом рН находилась в пределах 7,0-7,6. В ходе исследования также установлено, что при режиме вращения активатора 2700-3000 об/мин происходит мелкодисперсное вспенивание культуральной среды над вращающей шайбой аппарата. Такое явление приводит к ингибции роста, а использованная в нашем опыте поверхностная аэрация не обеспечивает эшерихий необходимым количеством растворимого кислорода.

По результатам проведенной работы считаем необходимым отметить, что выращивание эшерихий в газовихревом биореакторе целесообразно проводить путем подачи стерильного воздуха из расчета 1-2 дм³/дм³ через барботёр или комбинированным способом. Скорость вращения активатора должна быть в течение первых 2 часов 2000 об/мин, а далее 2200 об/мин.

При выращивании рожистых бактерий нами установлено, что в аппарате обеспечивается стерильность процесса. Первые 4 часа рекомендуем процесс выращивания вести в покое, а далее в течение последующих 6 часов – при скорости вращения активатора 1500 об/мин. культура рожистых бактерий обладает типичной морфологией и высокой жизнеспособностью. Общая концентрация микроорганизмов составила 8 млрд.м.к/см³. При этом жизнеспособность рожистых бактерий, полученных в аппарате газо-вихревого типа, была на 16% выше, чем при выращивании в стеклянном баллоне и биореакторе с механической мешалкой.

При выращивании пастерелл нами установлено, что процесс целесообразно вести первые 3-4 часа при вращении активатора 1000 об/мин, в последующем – 1200-1500 об/мин. Подачу воздуха необходимо осуществлять в объеме 1 дм³/дм³. Через 4 часа в культуральной среде содержался 1 млрд.м.к/см³, рН – 7,8; через 6 часов – концентрация антигена составила 4 млрд.м.к/см³, рН – 6,9; через 10 часов – соответственно 8 млрд.м.к/см³ и 6,7. При проведении микроскопии мазков, приготовленных из культур, отобранных через 4, 6 и 10 часов культивирования, и окрашенных по Граму, установлено, что микроорганизмы имеют типичные морфологические свойства, характерные для данного возбудителя. Процесс культивирования следует проводить в течение 10 часов.

Выращивание сальмонелл необходимо осуществлять путем подачи воздуха в аппарат поверхностным и глубинным способами (через барботёр) соответственно в объеме 1,2 и 0,6 дм³/дм³, скорости вращения активатора 1500-2000 об/мин и дробной подачи 40% раствора глюкозы при продолжительности роста 12 часов. При таком режиме культивирования накопление сальмонелл в аппарате «Биок» составило 24 млрд.м.к/см³, в то время как накопление культуры в биореакторе с механической мешалкой – 16 млрд.м.к/см³.

Для культивирования лактококков в ферментере необходимо использовать посевные культуры в экспоненциальной фазе роста (17 часов). Управляемое периодическое культивирование микробов в ферментерах газовихревого типа обеспечивает физиологически более активное состояние культур, увеличение максимальной скорости роста, минимальное время генерации по сравнению с традиционной технологией производства, интенсификацию процесса за счет уменьшения продолжительности выращивания лактококков на 12,5% (с 8 часов до 7 часов). При этом наблюдали более высокое накопление клеток – $1,6 \times 10^{10}$ КОЕ/см³, по сравнению с традиционной технологией ($5,0 \times 10^8$ КОЕ/см³).

В ходе исследования также установлено, что в фазе адаптации должен обеспечиваться режим вращения активатора 1200 об/мин (27 оборотов шайбы), а при вхождении в логарифмическую стадию роста – 1400 об/мин (36 оборотов шайбы). С учетом имеющихся теоретических данных был построен режим перемешивания с

поступальним збільшенням частоти роботи активатора починаючи з 600 об/мин (8 оборотів шайби) до 1400 об/мин (36 оборотів шайби).

Висновки: 1. Біореактор «Биок» з газовихревим перемішуванням дозволяє культивувати різні патогенні бактерії глибоким способом без використання пеногасителя і забезпечувати аерацію культуральної середовища як глибоким, так і поверхневим способом.

2. Газовихревий біореактор здійснює м'яке, але ефективне перемішування без утворення піни, гідродарів, кавітації, високо турбулентних і застоїв зон. В той же час газовий вихор є ефективним пеногасителем.

3. Біореактор легко масштабується і може забезпечити управляемість процесу культивування по наступним параметрам: рН, еН, рО₂, t°С.

4. Біореактор забезпечує ведення стерильного процесу культивування, легко управляється при монтажі і обслуговуванні. При роботі з ним не потрібно підготовка персоналу, працюючого на апаратах з механічним перемішуванням.

5. Апарат газовихревого типу дозволяє оптимізувати процес культивування, створити щадячі умови процесу, уникнути лизису культур і забезпечити їх високу життєспроможність.

6. Використання біореактора «Биок» забезпечує збільшення виходу цільового продукту, що дозволяє скоротити кількість апаратів для культивування (порівняно з біореакторами з механічним перемішуванням) і зменшити кількість виробничих площ. Можлива робота апарату при заповненні в межах 10-90%. Апарат споживає енергії на перемішування в 5-6 раз менше, ніж апарати з мешалкою.

7. В процесі культивування мікроаерофілів (лактобацилл) за рахунок високого поверхневого масообміну при неповному заповненні біореактора спостерігалася затримка росту мікроорганізмів, викликана інгібуванням кислородом. При подальшій роботі рекомендується проводити стерильну продувку інертним газом з метою створення анаеробних умов і запобігання токсичного впливу кисню на лактобацилли.

8. Використання біореактора в наукових дослідженнях дозволить розробити і організувати виробництво нових біологічних препаратів, підвищити стабільність і кількість доз в сухих живих вакцинах, а також знизити реактогенність і підвищити біологічну їх ефективність і технологічність виробництва.

9. Використовуючи біореактори нового типу можна розробити і організувати виробництво нових бактеріальних концентратів і підвищити стабільність їх кількісних показників.

Література

1. Апарат для суспензійного культивування кліток тканин або мікроорганізмів / В.І. Кислих, А.П. Репков, Ю.А. Рамазанов, І.Д. Вороб'єв // Патент Росії № 2099413. Опубліковано 20.04.1997.
2. Виестур, У.Е. Культивування мікроорганізмів / У.Е. Виестур, Н.Ж. Кристансонс. – М.: Пищова промисловість, 1980. – 231 с.
3. Вихревий біореактор «Биок» 1. Опыты культивирования штамма *E. coli* BL 21 (DE 3) rZZSA, продуцирующего рекомбинантный антигени человека / В.И. Кислих [и др.] // Биотехнология. – 2000. - № 4. – С. 72-79.
4. Вороб'єв, І.Д. Массообмен в клеточном культиваторе «Биоколь». Гидродинамика и процессы переноса в биореакторах / І.Д. Вороб'єв, В.І. Кислих, В.А. Харченко. – Новосибирск, 1989. – С. 35-40.
5. Газовихреві біореактори «Биок». Використання в сучасній біотехнології / Н.П. Мертвецов [и др.]. – Новосибирск: Наука, 2002. – 118 с.
6. К вопросу о моделировании течений в вихревой камере: Мат-лы междунар. конф. «Математические модели и методы их исследования (задачи механики сплошной

среды, экологии, технологических процессов) / Т.И. Зеленьяк [и др.]. – Красноярск, Россия, 25-30 августа 1997. – Красноярск, 1997. – С. 37-43.

7. The production of cell in air-vortex stirred bioreactors / B.S. Baibakov [et al.] // International Conference on Medical Biotechnology, Immunization and AIDS, June, 12-18, 1991. – Leningrad, 1991. – P. 234-238.

ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНІ ДАНІ КУЛЬТИВУВАННЯ ДЕЯКИХ БАКТЕРІЙ В ГАЗОВИХРЬОВОМУ БІОРЕАКТОРІ «БІОК»

Зайцев В.В.¹, к. вет. н., доцент, Рамазанов Ю.А.², Дремач Г.Е.³, к. вет. наук,
доцент

Зайцева А.В.³, аспірант, Сафроненко Л.В.⁴, к. техн. Наук, Тункель В.С.¹, старший
мікробіолог

¹ УП «Вітебська біофабрика», м. Вітебськ, Республіка Білорусь

² ЗАТ «Саяни», м. Новосибірськ, Росія, ³ УО «Вітебська державна ордена «Знак
Пошани» академія ветеринарної медицини», м. Вітебськ, Республіка Білорусь

⁴ РУП «Інститут м'ясомолочної промисловості», м. Мінськ, Республіка Білорусь

Анотація. Авторами статті приведені дані обробки параметрів культивування сальмонел, ешеріхій, пастерел, лептоспир, бактерій бешихи, молочнокислих бактерій в газовихрвовому біореакторі. Показана можливість використання апарата з ціллю створення нових біологічних препаратів і бактеріальних концентратів.

Ключові слова: культивування, газовихрвовий біореактор, сальмонели, ешеріхії, пастерели, лептоспіри, бактерії бешихи, молочнокислі бактерії.

EXPERIMENTAL DATA ON CULTIVATION OF SOME BACTERIA IN A GASOVORTICAL BIOREACTOR «BIOK»

Zaitcev V.V.¹, PhD in veterinary sciences, senior lecturer, Ramazanov U.A.², director for
science

Dremach G.E.³, PhD in veterinary sciences, senior lecturer, Zaitceva A.V.³, a post-graduate
student of the Department of microbiology and virology, Saphronenko L.V.⁴, PhD in technical
sciences

Tunkel V.S.¹, senior microbiologist, ¹ UE «Vitebsk Biofactory» Vitebsk, The Republic of
Belarus

² PLC «Sajany» Novosibirsk, Russia, ³ EE «Vitebsk «Badge of Honour» Order State
Academy of Veterinary Medicine» Vitebsk, The Republic of Belarus, ⁴ RUE «The Institute of
Meat and Milk Industry» Minsk, The Republic of Belarus

Summary. The data are given by the authors on the development of cultivation parameters for salmonellae, escherichiae, pasteurellae, leptospirae, erysipelatos and lactic-acid bacteria in the gasovortical bioreactor. The possibility is demonstrated for the apparatus to be used for the purpose of development of new biological preparations and bacterial concentrates.

Key words: cultivation, gasovortical bioreactor, salmonellae, escherichiae, pasteurellae, leptospirae, erysipelatos bacteria, lactic-acid bacteria.