Оптимизация питательной среды на основе молочной сыворотки для культивирования штамма нефтеокисляющих дрожжей Rhodotorula glutinis

В.В. Мартынов, Н.Н. Шергина

Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина, г. Сыктывкар

процессе производства молочных продуктов, основанном на выделении концентрировании всех или части белков молока, происходит высвобождение значительных количеств молочной сыворотки - ценного побочного сырья [1]. Молочная сыворотка содержит до 50% 200 сухих веществ молока около различных соединений, числе И тонкодиспергированный молочный жир, растворимые азотистые соединения и минеральные соли, лактоза, а также витамины, ферменты, органические кислоты [1, 2].

В России действует большое количество молокоперерабатывающих предприятий (более 2000), при этом объем перерабатываемой сыворотки составляет всего 26%. На многих молочных предприятиях не установлены оборудования для сбора и переработки молочной сыворотки около 80 % сыворотки сбрасывается в сточные воды, что негативно сказывается на основных показателях сточных вод (БПК). Тонна молочной сыворотки, слитая в сточные воды, загрязняет водоем сопоставимо со 100 м³ хозяйственно-бытовых стоков [1, 2]. Все это доказывает необходимость и целесообразность организации полного сбора и переработки молочной сыворотки и других молочных продуктов.

Одна из важных задач биотехнологии - поиск возможностей культивирования микроорганизмов на отходах различных промышленных производств. В качестве основы для питательных сред используют различные отходы сельскохозяйственной, деревообрабатывающей и нефтяной промышленности, крахмалопаточного производства. Однако молочную сыворотку используют редко, хотя её количество как отхода, и химический состав позволяют создавать на её основе питательные среды для большого количества различных микроорганизмов.

Целью нашего исследования стал подбор компонентов питательной среды на основе молочной сыворотки для глубинного культивирования нефтеокисляющего штамма *Rhodotorula* glutinis BKM Y-2993D.

Штамм *Rhodotorula glutinis* BKM Y-2993D был любезно предоставлен научными сотрудниками лаборатории биохимии и биотехнологии растений Института биологии Коми НЦ УрО РАН. В качестве основы для питательной среды использовалась молочная сыворотка, полученная с Молокозавода г. Сыктывкар. Молочная сыворотка имела рН = 6.0 и представляла собой нативную молочную сыворотку.

Оптимизация питательной среды проводилась по методу Бокса-Уилсона [3].

Предварительно проведённые исследования показали возможность роста штаммов *Rhodotorula glutinis* ВКМ Y-2993D на питательной среде на основе молочной сыворотки. Глубинное культивирование на питательных средах: среда Чапека с сахарозой; среда Чапека с лактозой; обезжиренная сыворотка без микроэлементов; обезжиренная сыворотка с микроэлементами, показало, что на среде Чапека с сахарозой рост дрожжей незначителен, а на среде Чапека с лактозой - вообще отсутствует. Нефтеокисляющие штаммы дрожжей хорошо растут на сыворотке с добавлением минеральных компонентов. На 9 сутки культивирования численность *Rhodotorula glutinis* в среде Чапека с сахарозой составила 2•10⁷ КОЕ/ 100 мл культуральной жидкости (КЖ), на сыворотке без микроэлементов - 4•10⁷ КОЕ/ 100 мл КЖ, а на сыворотке с микроэлементами - 4.5•10⁷ КОЕ/ 100 мл КЖ.

При подборе компонентов питательной среды руководствовались прописями питательных сред для культивирования дрожжей [4, 5]. Для оптимизации питательной среды были выбраны следующие компоненты: молочная сыворотка (как основной источник энергии и питательных веществ), минеральные соли NaNO₃, K₂HPO₄, KCl. Была построена матрица планирования эксперимента и рассчитаны концентрации веществ на максимальном и минимальном уровнях, выбран интервал варьирования признака для каждого элемента питательной среды (таблица 1).

Таблица 1 – Матрица планирования эксперимента по методу Бокса-Уилсона

		Наименование факторов (концентраций компонентов среды)						
		Сыворотка, %	ыворотка, % NaNO3, %		KCl, %			
Основной уровень $(S_j)_0$		67,0	1,3	0,70	0,3			
Максимальный уровень $(S_j)_{max}$		100,0	3,0	2,0	1,0			
Минимальный уровень (Sj) _{min}		0,0	0,0	0,0	0,0			
Интервал варьирования λ і		7,0	0,3	0,1	0,1			
Матрица планирования	1	(-) 60,0	(-) 1,0	(-) 0,6	(-) 0,2			
эксперимента	2	(+) 74,0	(-) 1,0	(-) 0,6	(+) 0,4			
	3	(-) 60,0	(+) 1,6	(-) 0,6	(+) 0,4			
	4	(+) 74,0	(+) 1,6	(-) 0,6	(-) 0,2			
	5	(-) 60,0	(-) 1,0	(+) 0,8	(+) 0,4			
	6	(+) 74,0	(-) 1,0	(+) 0,8	(-) 0,2			
	7	(-) 60,0	(+) 1,6	(+) 0,8	(-) 0,2			
	8	(+) 74,0	(+) 1,6	(+) 0,8	(+) 0,4			

Эксперимент проводили дважды (2 серии) с восьмью вариантами питательной среды, согласно матрице планирования эксперимента. Культивирование дрожжей проводили в колбах

объемом 250 мл (объем рабочей среды – 100 мл) на встряхивателе Sky Line при 200 об./мин. при комнатной температуре (21° C - 23° C). Титр засеянного инокулята составил $8,7 \cdot 10^{6}$ КОЕ/мл. Подсчёт количества клеток проводился в камере Горяева.

Культивирование проводили в течение 7 суток. Длительность культивирования обуславливалась появлением окраски биомассы дрожжей в ферментационной жидкости, что свидетельствовало о накоплении в клетках дрожжей пигмента и переходу культуры к вторичному метаболизму [6]. Для подтверждения момента выхода культуры в стадию стационарного роста (максимального накопления биомассы) ежедневно проводили отбор ферментационной жидкости для подсчета КОЕ дрожжей в лабораторных колбах.

Полученные результаты по количеству клеток в ферментационной жидкости на 7 сутки культивирования отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Численность дрожжей *Rhodotorula glutilis* при культивировании по методу Бокса-Уилсона (7 сутки)

	Численность <i>Rhodotorula glutilis</i> , КОЕ · 10 ⁵ / мл									
№ варианта	1	2	3	4	5	6	7	8		
1 серия	785	788	535	697	541	605	608	798		
2 серия	907	903	630	840	659	767	796	900		

По результатам двух серий эксперимента были рассчитаны коэффициенты регрессии для каждого фактора (концентраций элементов среды). Было получено уравнение регрессии:

$$P = 734,94 + 52,31 b_1 - 9,44 b_2 - 25,69 b_3 - 15,69 b_4$$

где b_1 – фактор 1 (молочная сыворотка), b_2 – фактор 2 (NaNO₃), b_3 – фактор 3 (K₂HPO₄), b_4 – фактор 4 (KCl).

Анализируя уравнение регрессии и коэффициенты регрессии, полученные для каждого компонента питательной среды, можно отметить, что все коэффициенты, кроме первого при b₁, имеют отрицательный знак. Это означает, что при увеличении концентрации фактора 1, концентрация биомассы (количество клеток) увеличивается, а при увеличении концентрации факторов 2, 3 и 4 концентрация биомассы уменьшается. Величина коэффициента указывает на силу влияния фактора. Из всех исследуемых факторов наиболее сильное положительное влияние имеет молочная сыворотка, наименьшее отрицательное влияние оказывает концентрация нитрата натрия (NaNO₃).

Определение значимости коэффициентов уравнения регрессии можно провести с помощью статистической обработки: определения дисперсии воспроизводимости процесса и доверительного интервала. Дисперсию воспроизводимости (σ^2) определяем по формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{u=1}^{N} \sum_{j=1}^{\gamma} \left(P_j - \bar{P} \right)^2}{\left(\gamma - 1 \right) N}.$$

где P_j – значение количества клеток, полученное при культивировании, в каждом варианте серии;

 \bar{P} - среднее значение количества клеток, полученное при культивировании на одинаковой среде; у - количество одинаковых сред (повторных серий); N – количество вариантов.

Доверительный интервал (ϵ) определяем по формуле:

$$\varepsilon = t \sqrt{\frac{\sigma^2}{N\gamma}} = t \sqrt{\frac{\sum \sum (P_u - \overline{P})^2}{(\gamma - 1) N^2 \gamma}}.$$

Значение коэффициента t - критерия Стьюдента определяем по таблице. Для надежности оценки для 95% критерий Стьюдента зависит только от числа степеней свободы f, при которых находили дисперсию воспроизводимости $f = (\gamma - 1)$ N. В нашем случае t = 2,31.

Для нашего эксперимента получили следующие значения $\sigma^2 = 8968,69$; $\epsilon = 54,69$. Сравнивая коэффициенты уравнения регрессии с рассчитанным доверительным интервалом, отмечаем, что в уравнении нет значимых коэффициентов, по значимости к нему приближается только коэффициент при факторе 1. Незначимость коэффициентов может быть вызвана разными факторами: взяты слишком малые интервалы варьирования фактора, плохая воспроизводимость процесса; фактор находится на уровне близком к оптимальному; фактор не влияет на процесс вообще или в это области измерений.

Чтобы определить адекватность математического описания процесса культивирования нужно определить степень адекватности по критерию Фишера. Дисперсию адекватности определяем по формуле:

$$\sigma_a^2 = \frac{\sum \left(\bar{P}_u - \hat{P}_u\right)^2}{N - n - 1},$$

где n — число факторов в уравнении, N — число вариантов опытов (условий), по которым определяется дисперсия адекватности, u — номер вариантов среды, к которому относится $ar{P}_u$ и \hat{P}_u .

Степень адекватности математического описания оценивают по критерию Фишера, который определяют по формуле: $\mathbf{F} = \sigma_a^2 \ \gamma \ / \ \sigma_p$. Множитель γ в числителе, связан с тем, что дисперсия воспроизводимости определяется для среднего из γ повторений.

В нашем случае $F_p = 4,00$ ($F_T = 4,07$ для уровня значимости p = 0,05) выполняется условие F_p < F_T , что говорит об адекватности математического описания нашей модели.

Полученное нами соотношение показывает взаимосвязь накопления биомассы с такими факторами, как концентрации молочной сыворотки, минеральных солей: NaNO₃, K₂HPO₄, KCl. На параметр оптимизации перечисленные факторы влияют пропорционально, на что указывают линейные эффекты. С увеличением значения фактора 1 (молочная сыворотка), с уменьшением факторов 2, 3 и 4 (концентрация в питательной среде NaNO₃, K₂HPO₄, KCl, соответственно) должно увеличиваться количество биомассы в ферментационной жидкости. Наибольшее влияние на накопление биомассы оказывает концентрация молочной сыворотки. Следует обратить внимание на то, что увеличение концентраций солей (NaNO₃, K₂HPO₄, KCl) в питательной среде негативно сказывается на увеличении биомассы. Все компоненты питательной среды оказались не значимыми. Объяснение данного явления следует искать в том, что выбранные нами факторы находятся на уровнях близких к оптимальным. Поэтому дальнейший расчет концентраций для изучаемых факторов питательной среды методом крутого восхождения можно не использовать.

Список литературы

- 1. Залашко, М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки [Текст]: / М.В. Залашко. М.: Агропромиздат, 1990. 192 с.
- 2. Храмцов А.Г. Феномен молочной сыворотки [Текст]: / А.Г. Храмцов. СПб. Профессия, 2011. 804 с.
- 3. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии [Текст] / В.В. Бирюков. М.: КолосС, 2004. 296 с.
- 4. Бабьева И.П. Биология дрожжей [Текст]: / И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов. М.: 2004. 239 с.
- 5. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии [Текст]: Учебное пособие для студентов высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др,; под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия» 2005. 608 с.
- 6. Даволи П. Каротиноиды и жирные кислоты в красных дрожжах *Sporobolomyces roseus* и *Rhodotorula glitinis* // Прикладная биохимия и микробиология [Текст]: / П. Даволи, В. А. Мирау, Р. В. С. Вебер. 2004, Т. 40, № 4, С. 460 465.