




Научная статья
4.3.3 – Пищевые системы (технические науки)
УДК57.083.132

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.004

 EDN: ERQKFM

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ pH НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *VACILLUS*

Иван Юрьевич Евдокимов¹, Алена Николаевна Иркитова²,
Ангелина Владимировна Малкова³, Дина Евгеньевна Дудник⁴,
Максим Вячеславович Ширманов⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

¹ ivan.evdokimov.92@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6218-3151>

² elen171987@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2664-1995>

³ gelishka96@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4053-036X>

⁴ dudnik-dina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2086-8144>

⁵ maks-shirmanov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1628-2546>

Аннотация. При разработке биопрепаратов актуальной задачей промышленного производства является ускорение процесса ферментации, усовершенствование условий производства, а также наибольший выход целевого продукта за меньшее количество циклов. На глубинное культивирование бактерий влияют состав питательных сред, температура, время культивирования, доза инокулята, особенности штамма микроорганизма, кислотность среды и многие другие. Активная кислотность питательной среды влияет на скорость биохимических реакций в клетке, потребление субстратов и накопление биомассы. Установление оптимального для роста бактерий pH также позволяет скорректировать технологические условия промышленного глубинного культивирования в биореакторах и продлить период активного накопления биомассы. Цель исследования заключалась в определении оптимальной активной кислотности среды при глубинном культивировании бактерий *V. putillus* В-13250 и *V. toyoensis* В-13249 для дальнейшего опытно-промышленного культивирования в условиях ферментеров.

Объектами исследования явились два штамма: *V. toyoensis* и *V. putillus*, из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ. Использовались стандартные среды для глубинного (L-бульон) и поверхностного (твердая L-среда) культивирования. Глубинное культивирование проводилось в шейкере-инкубаторе «Innova 44», в качалочных колбах. Для определения оптимального pH изучались варианты установок: 5,6, 6,2, 6,8, 7,4; температура культивирования – 37 °С, скорость перемешивания – 250 об/мин, 24 ч – время культивирования.

В результате работ выяснено, что оптимальный показатель активной кислотности среды для культивирования обоих исследуемых штаммов составил 6,8. Оба штамма способны расти и развиваться при отклонениях от оптимума: в значениях pH от 5,6, до 7,4. Также стало понятно, что при использовании данных микроорганизмов в качестве основы пробиотиков есть возможность выбора большего диапазона условий жизни относительно кислотности внешней среды.

Ключевые слова: *Vacillusputillus*, *Vacillustoyoensis*, водородный показатель, глубинное культивирование, ферментация, пробиотики, биореактор, биопродукты.

Благодарности: авторы выражают благодарность всему коллективу Инжинирингового центра «Промбиотех» за помощь в проведении исследований.

Для цитирования: Влияние уровня pH на показатели глубинного культивирования пробиотических штаммов *Vacillus* / И. Ю. Евдокимов [и др.] // Ползуновский вестник. 2023. № 1. С. 29–36. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.004. EDN: <https://elibrary.ru/ERQKFM>.

Original article

NFLUENCE OF pH LEVEL ON INDICATORS OF DEEP CULTURING OF *BACILLUS* PROBIOTIC STRAINS

Ivan Yu. Evdokimov¹, Alena N. Irkitova², Angelina V. Malkova³,
Dina E. Dudnik⁴, Maksim V. Shirmanov⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} Altai State University, Barnaul, Russia

¹ ivan.evdokimov.92@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6218-3151>

² elen171987@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2664-1995>

³ gelishka96@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4053-036X>

⁴ dudnik-dina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2086-8144>

⁵ maks-shirmanov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1628-2546>

Abstract. *The active acidity of the nutrient medium affects the rate of biochemical reactions in the cell, the consumption of substrates and the accumulation of biomass. The purpose of this study was to determine the optimal active acidity of the medium during submerged cultivation of bacteria *B. pumilus* B-13250 and *B. toyonensis* B-13249 for further experimental-industrial cultivation under fermenter conditions and using probiotic preparations as the basis.*

*The objects of the study were two strains of rhizospheric spore bacteria: *B. toyonensis* and *B. pumilus*, from the collection of the Research Center «Prombiotech» AltSU. Standard media were used for deep (L-broth) and surface (solid L-medium) cultivation. Deep cultivation was carried out in an «Innova 44» shaker-incubator, in rocking flasks. To determine the optimal pH, options for settings were studied: 5.6, 6.2, 6.8, 7.4; cultivation temperature - 37 °C, stirring speed - 250 rpm, 24 h - cultivation time.*

As a result of the work, it was found that the optimal indicator of the active acidity of the medium for cultivating both studied strains was 6.8. Both strains are able to grow and develop with deviations from the optimum: in pH values from 5.6 to 7.4.

Keywords: *Bacillus pumilus, Bacillus toyonensis, pH value, deep cultivation, fermentation, probiotics, bioreactor, bioproducts.*

Acknowledgements: *the authors express their gratitude to the entire staff of the Engineering Center «Prombiotech» for their help in conducting research.*

For citation: Evdokimov, I.Yu., Irkitova, A.N., Malkova, A.V., Dudnik, D.E. & Shirmanov, M.V. (2023). Nfluence of pH level on indicators of deep culturing of bacillus probiotic strains. *Polzunovskiy vestnik*, (1), 29-36. (In Russ.). doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.004. EDN: <https://elibrary.ru/ERQKFM>.

ВВЕДЕНИЕ

Производство современных отечественных биопрепаратов – стратегически важная задача для науки, промышленности, сельского хозяйства и экономики страны в целом. При этом в промышленном производстве бактериальных препаратов важнейшими задачами являются ускорение процесса ферментации, усовершенствование условий производства, а также наибольший выход целевого продукта [1–4]. На качество и эффективность глубинного культивирования бактерий влияют различные факторы: состав питательных сред, температура, время культивирования, доза инокулята, особенности штамма микроорганизма, кислотность среды и многие другие. В связи с этим большое количество современных научных работ посвя-

щено оптимизации условий культивирования путем их изменения для благоприятного роста организмов [5–7].

Цикл развития бактериальной культуры начинается с помещения инокулята в благоприятную среду для ее роста. Активная кислотность питательной среды влияет на скорость биохимических реакций в клетке, потребление субстратов и накопление биомассы. Многими учеными [8–12] установлено, что значение pH в нейтральном положении (6,5–7,5) является благоприятным для роста бактерий рода *Bacillus*, поддержание заданного pH, на благоприятном для клеток уровне, позволяет продлить фазу активного роста спорообразующих микроорганизмов. При производстве биологических препаратов установление оптимальной для роста бактерий активной кислотности культуральной

ПОЛЗУНОВСКИЙ ВЕСТНИК № 1 2023

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ pH НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *BACILLUS*

жидкости также позволяет скорректировать технологические условия промышленного глубинного культивирования бактерий в биореакторах и, таким образом, продлить период активного накопления биомассы. При отсутствии поддержания значений активной кислотности на оптимальном для бактерий уровне быстро происходит закисление культуральной жидкости за счет экскретирования в среду метаболитов обмена клеток и, как следствие, – ингибирование роста.

Цель данной работы: определение оптимальной активной кислотности среды при глубинном культивировании спорообразующих бактерий *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249, для дальнейшего их опытно-промышленного культивирования в условиях биореактора и использования в качестве основы пробиотических препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования: штамм *B. pumilus* В-13250, выделенный из ризосферы р. *Cichorium*, штамм *B. toyonensis* В-13249 – из ризосферы р. *Helianthus* (коллекция ИЦ «Промбиотех» АлтГУ).

Питательные среды: L-бульон в качестве основной среды для глубинного культивирования в колбах, на основе пептона и дрожжевого экстракта. Твердая L-среда для контроля численности микроорганизмов. Эндо-среда для санитарного контроля.

Глубинное культивирование каждого штамма проводили в шейкере-инкубаторе «Innova 44» (New Brunswick, USA) Культивирование проводилось в качалочных колбах Эрленмейера объемом 500 мл, с заполнением 200 мл культуральной жидкости. Эксперименты проводились в 5-кратной повторности.

Исследованные значения pH среды для культивирования: 5,6, 6,2, 6,8, 7,2; температура культивирования составляла 37 °С, скорость перемешивания – 250 об/мин, 24 ч – время культивирования, эксцентриситет платформы – 5 см. Для корректирования значений pH среды использовался 20%-ый раствор гидроксида натрия. Для измерения pH

использовали стационарный pH-метр «FG2» (Mettler-Toledo, Switzerland).

В первоначально простерилизованной жидкой L-среде измерялся pH, доводился до задаваемого значения (5,6, 6,2, 6,8, 7,4), после чего производился посев инокулятом. Через 1 час культивирования колбы вынимались из шейкера, стерильно производился замер и корректировка уровня pH. Следующий замер и корректировка производились через 4 инкубации. Окончательный результат измерялся по истечении суток культивирования (24 ч), где дополнительно производилась микроскопия каждого образца, измерение оптической плотности (OD490) и учет численности бактерий высевом на твердую питательную среду с применением метода десятикратных разведений.









РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После первого часа культивирования штамма *B. pumilus* В-13250 практически во всех исследуемых вариантах, за исключением изначально сверхнизкого – 5,6, показатель активной кислотности стал понижаться, поэтому производилась корректировка кислотности в вариантах 6,2, 6,8, 7,4 до первоначально заданной отметки. Через 4 часа культивирования уровень кислотности в варианте со значением pH в 5,6 также остался на прежнем уровне. При этом в вариантах с исходными значениями pH среды 6,2, 6,8, 7,4 наблюдалось повышение уровня кислотности. Особенно значительно кислотность увеличилась в вариантах со значениями предустановок 6,8 и 7,4: до $5,99(\pm 0,03)$ и $6,43(\pm 0,04)$ соответственно. Это может быть связано с тем, что при данных значениях pH культура развивалась активнее и окисляющих продуктов обмена выделяла больше.

После измерений следовала корректировка целевых заданных параметров pH, колбы снова ставились в шейкер-инкубатор для продолжения культивирования. Через 24 часа по окончании эксперимента колбы снимались и замерялись конечные значения показателей. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Технологические показатели культивирования *B. Pumilus* B-13250 при разных вариантах pH среды

Table 1 - Technological indicators of cultivation of *B. pumilus* B-13250 at different pH conditions

pH	pH в момент культ-я			ОП, 24 ч	Микроскопия, 24 ч	Морфология колоний, 24 ч
	1 ч	4 ч	24 ч			
Инокулят			7,32 (±0,22)	1,025 (±0,173)		
5,6	5,60 (±0,01)	5,63 (±0,02)	6,69 (±0,15)	0,382 (±0,065)		
6,2	6,17 (±0,03) ↑	5,75 (±0,12) ↑	7,05 (±0,48)	0,530 (±0,114)		
6,8	6,52 (±0,06) ↑	5,99 (±0,03) ↑	7,00 (±0,06)	0,849 (±0,080)		
7,4	7,14 (±0,04) ↑	6,43 (±0,04) ↑	7,10 (±0,15)	0,628 (±0,059)		

При окончании культивирования показатель pH был в нейтральных значениях во всех исследуемых вариантах, самый низкий показатель зафиксирован при pH 5,6 – 6,69(±0,15). Это говорит, что параметры оптимального роста культуры стремятся в нейтральное положение, только при корректировке в 5,6 требуется длительное время и складываются неблагоприятные условия для оптимального роста. При этом наибольшая

оптическая плотность наблюдается в варианте с pH = 6,8 и равна 0,849(±0,080), что на 2 десятых значения выше от ближайшего в установке 7,4 (0,628(±0,059)). По микроскопии отмечено, что при культивировании на всех вариантах pH среды в течение 24 часов роста все клетки находятся в активной вегетативной форме. Визуально принципиальной разницы в количестве или размерах клеток не обнаружено, что подтверждает возможность









**ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ pH НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *BACILLUS***

развития данного штамма при разных значениях pH. Морфология колоний при разных значениях pH также однородна.

Результаты исследования оптимального уровня кислотности для культивирования штамма *B. toyonensis* B-13249 представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Технологические показатели культивирования *B. toyonensis* B-13249 при разных вариантах pH среды

Table 2 - Technological indicators of cultivation of *B. toyonensis* B-13249 at different pH conditions

pH	pH в момент культ-я			ОП, 24 ч	Микроскопия, 24 ч	Морфология колоний, 24 ч
	1 ч	4 ч	24 ч			
Ино-кулят			7,32 (±0,20)	1,024 (±0,215)		
5,6	5,68 (±0,05)	5,20 (±0,03)↑	7,02 (±0,21)	0,759 (±0,106)		
6,2	6,13 (±0,01) ↑	5,30 (±0,02)↑	6,98 (±0,13)	0,656 (±0,107)		
6,8	6,57 (±0,08) ↑	5,80 (±0,07)↑	7,05 (±0,24)	0,991 (±0,076)		
7,4	7,14 (±0,09) ↑	6,28 (±0,12)↑	7,32 (±0,11)	0,745 (±0,137)		

У штамма *B. toyonensis* B-13249 после первого часа культивирования также при установках 6,2, 6,8, 7,4 показатель активной

кислотности стал понижаться (производились корректировки), при показателе 5,6 кислот-

ность незначительно понизилась ($5,68(\pm 0,05)$), и корректировки pH не производилось.

Через 4 часа культивирования сдвиг в кислую сторону pH произошел во всех вариантах установок, включая и изначально низкую – с 5,6 до $5,20(\pm 0,03)$. Наибольшее отклонение произошло при установке 7,4 до $6,28(\pm 0,12)$, что само по себе больше целого значения в единицу ($1,12(\pm 0,12)$), что тоже соответствует наиболее предрасположенным условиям жизни данной культуры.

При окончании культивирования (24 часа) наибольшее значение pH было при установке в 7,4– $7,32(\pm 0,11)$, что, в свою очередь, говорит о том, что значение установки в 7,4 также не совсем благоприятно сказывается для роста культуры, и микроорганизмы стремятся понизить задаваемое значение.

Аналогичные данные у культуры *B. toyonensis* B-13249 при установке pH в 6,8, значение оптической плотности – $0,991(\pm 0,076)$ значительно больше ближайшего значения – $0,759(\pm 0,106)$, как ни странно, получившейся при установке в 5,6, что может объясняться более продолжительным временем для восстановления кислотности среды.

По микроскопии отмечено, что при культивировании на всех вариантах pH среды в течение на 24 часов роста все клетки нахо-

дятся в активной вегетативной форме. При визуальной оценке наибольшее их количество наблюдалось в пробе с предустановленным pH в 6,8, оптическая плотность в данной пробе была также самой большой – $0,991(\pm 0,076)$. Морфология колоний данного штамма при разных значениях pH однородна.

Таким образом, через 24 часа культивирования значение активной кислотности стремится к нейтральному положению, и в вариантах 5,6, 6,2, 6,8 значение pH у обоих исследуемых штаммов переросло изначально заданный уровень. При установке же 7,4 лишь в некоторых повторностях у *B. toyonensis* B-13249 значение незначительно (на 0,01), превышало задаваемый параметр. В исследованиях *B. pumilus* B-13250 значение в 7,4 не достигалось ни разу. Это говорит о том, что оптимальный pH среды для культивирования исследуемых штаммов находится в стандартном для большинства бактерий нейтральном значении.

Наибольшее количество живых клеток обнаружено при культивировании штаммов на среде с pH = 6,8: *B. pumilus* B-13250 – $3,65(\pm 0,75) \times 10^9$, *B. toyonensis* B-13249 – $1,25(\pm 0,80) \times 10^9$. При этом наименьшие значения у штамма *B. pumilus* B-13250 – $2,15(\pm 1,15) \times 10^9$ наблюдались при pH среды 5,6, а у *B. toyonensis* B-13249 – $5,40(\pm 2,73) \times 10^8$ при pH среды 7,4 (рисунок 1).

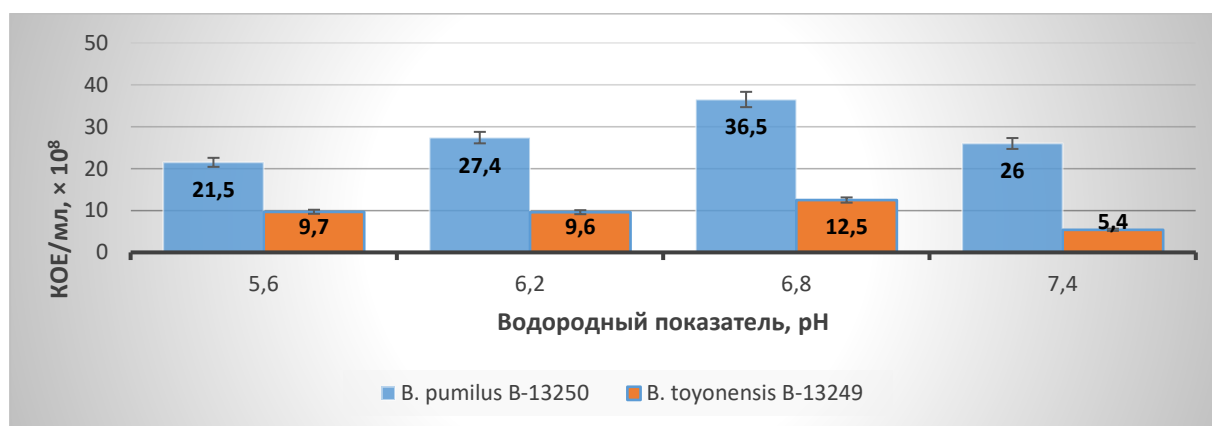


Рисунок 1 – Влияние кислотности среды культивирования на количество *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249

Figure 1 - The influence of the acidity of the cultivation medium on the number of *B. pumilus* B-13250 and *B. toyonensis* B-13249

Таким образом, для дальнейших исследований глубинного культивирования обоих исследуемых штаммов в условиях биореактора оптимальным вариантом pH среды является 6,8, что косвенно говорит об их биосовместимости и о возможности их совместного использования в качестве основы биологических препаратов. Но следует отметить,

что при всех исследуемых установках активной кислотности среды, культуры микроорганизмов сохранили жизнеспособность, ни в одном эксперименте не наблюдалось массовой гибели. Полученные данные о возможности роста и развития культур при разных значениях pH свидетельствуют о перспективности включения обоих штаммов в состав био-

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ pH НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *BACILLUS*

логических препаратов. Оптимизация глубинного культивирования бактерий с помощью корректировки pH среды позволяет решить одну из биотехнологических задач по получению многокомпонентных пробиотических препаратов путем увеличения продуктивности (количества клеток с 1 цикла ферментации), что, в свою очередь, повышает экономическую эффективность производства.

ВЫВОДЫ

1. Оптимальный показатель активной кислотности среды для культивирования штамма *B. pumilus* B-13250: 6,8.
2. Оптимальный показатель активной кислотности среды для культивирования штамма *B. toyonensis* B-13249: 6,8.
3. Оба исследуемых штамма способны расти и развиваться при отклонениях от оптимума: в значениях pH от 5,6, до 7,4.
4. При использовании данных микроорганизмов в качестве основы пробиотика появляется возможность большего выбора диапазона условий по кислотности внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пискаева А.И., Просеков А.Ю. Оптимизация параметров культивирования консорциума микроорганизмов – деструкторов кератина в биотехнологических целях // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». 2016. Т. 16. С. 53–61.
2. Оптимизация среды культивирования амидосодержащих бактерий / Ю.Г. Максимова [и др.] // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2017. № 2. С. 193–199.
3. Фирсова М.С., Евграфова В.А., Потехин А.В. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragalinarum* // Ветеринария сегодня. 2019. № 2. С. 12–16. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2019-2-29-12-16>.
4. Оптимизация технологии производства пробиотика на основе споровых бактерий *Bacillus pumilus* B-13250 и *Bacillus toyonensis* B-13249 / И.Ю. Евдокимов [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2022. Т. 18. № 3. С. 20–27.
5. Optimization of fermentation medium for acetoin production by *Bacillus subtilis* sf4-3 using statistical methods / Y. Tian [et al.] // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2014. Vol. 44. No 5. P. 529–543. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.835731>.
6. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed / M. Ye [et al.] //

R. Soc. open sci. 2017. Vol. 4. 171012. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.171012>.

7. Подбор оптимальных параметров культивирования штаммов молочнокислых бактерий, перспективных в качестве стартерных культур при разработке закваски прямого внесения / Э. Нагызбеккызы [и др.] // International journal of applied and fundamental research. 2019. № 7. С. 14–18.

8. Lincoln L., More S.S. Comparative evaluation of extracellular b-D-fructofuranosidase in submerged and solid-state fermentation produced by newly identified *Bacillus subtilis* strain // Journal of Applied Microbiology. 2018. No 125. P. 441–456. <https://doi.org/10.1111/jam.13881>.

9. Мартынова К.В. Бактериологическая идентификация бактерий *Bacillus coagulans*, выделенных из томатов и томатосодержащих продуктов питания // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2019. № 2. С. 9–13. <https://doi.org/10.24411/2074-5036-2019-10019>.

10. Effects of solution pH and Ions on suicidal germination of *Bacillus subtilis* spores induced by medium high temperature-medium high hydrostatic pressure treatment / K. Morimatsu [et al.] // Biocontrol Science. 2019. Vol. 24. № 3. P. 167–172.

11. Optimization of Culture Conditions for Protease Production using Three Strains of *Bacillus*. / C.J. Morabandza [et al.] // Journal of Pure and Applied Microbiology. 2021. Vol. 15. No 2. P. 621–629. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.2.05>.

12. Xylanase from thermotolerant *Bacillus haynesii* strain, synthesis, characterization, optimization using Box-Behnken Design, and biobleaching activity. / M.M. Bakry [et al.] // Biomass Conversion and Biorefinery. 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03043-6>.

Информация об авторах

И. Ю. Евдокимов – и.о. заместителя директора, младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

А. Н. Иркитова – кандидат биологических наук, директор, ведущий научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

А. В. Малкова – аспирант кафедры экологии и биотехнологии, младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

Д. Е. Дудник – аспирант кафедры экологии и биотехнологии, лаборант-исследователь ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

М. В. Ширманов – младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

REFERENCES

1. Piskaeva, A.I. & Prosekov, A.YU. (2016). Optimizatsiya parametrov kul'tivirovaniya konsorciuma mikroorganizmov – destruktorov keratina v biotekhnologicheskikh tselnykh. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya «Biologiya. Ekologiya»*. (16). 53-61. (In Russ.).
2. Maksimova, YU.G., Garina, A.A., Vasil'ev, D.M. & Maksimov, A.YU. (2017). Optimizatsiya sredey kul'tivirovaniya amidazosoderzhashchih bakterij. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya*. (2). 193-199. (In Russ.).
3. Firsova, M.S., Evgrafova, V.A. & Potekhin, A.V. (2019). Podbor pitatel'noy sredey i optimizatsiya rezhima glubinnogo kul'tivirovaniya Avibacterium paragallinarum. *Veterinarnaya segodnya*. (2). 12-16. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2019-2-29-12-16>. (In Russ.).
4. Evdokimov, I.Yu., Irkitova, A.N., Malkova, A.V., Dudnik, D.E. & Shirmanov, M.V. (2022). Optimizatsiya tekhnologii proizvodstva probiotika na osnove sporovyh bakterij Bacillus pumilus B-13250 i Bacillus toyonensis B-13249. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologiiim. YU.A. Ovchinnikova*. 18(3). 20-27. (In Russ.).
5. Yixiao Fan, Xiangying Zhao, Jiayang Zhang, Liping Yang & Jianjun Liu. (2014). Optimization of fermentation medium for acetoin production by *Bacillus subtilis* sf4-3 using statistical methods. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 44(5). 529-543. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.835731>.
6. Miao Ye, Linghong Sun, Ru Yang, Zaigui Wang and Ke Zong Qi (2017). The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefacien* sand its application to goose feed. (4). 171012. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.171012>.
7. Nagyzbekkyzy, E., Moldagulova, N.B., Sembayeva, D.Zh., Sembayev, K.D., Moldagulova, E.B. & Duambekov, M.S. (2019). Selection of optimal parameters for the cultivation of lactic acid bacteria strains, promising as starter cultures for the development of direct application starter culture. *International journal of applied and fundamental research*. (7), 14-18. (In Russ.).
8. Lincoln, L. & More, S.S. (2018). Comparative evaluation of extracellular b-D-fructofuranosidase in submerged and solid-state fermentation produced by newly identified *Bacillus subtilis* strain. // *Journal of Applied Microbiology*. (125). 441-456. <https://doi.org/10.1111/jam.13881>.
9. Martynova, K.V. (2019). Bakteriologicheskaya identifikatsiya bakterij Bacillus coagulans, vydelennyh iz tomatov i tomatosoderzhashchih produktov pitaniya. *Aktual'nye voprosy veterinarnoy biologii*. (2). 9-13. <https://doi.org/10.24411/2074-5036-2019-10019>. (In Russ.).
10. K. Morimatsu [et al.]. (2019). Effects of solution pH and Ions on suicidal germination of *Bacillus subtilis* spores induced by medium high temperature-medium high hydrostatic pressure treatment. *Biocontrol Science*. 24(3). 167-172.
11. Morabandza, C.J. [et al.]. (2021). Optimization of Culture Conditions for Protease Production using Three Strains of *Bacillus*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 15 (2). 621-629. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.2.05>.
12. Bakry, M.M. [et al.]. (2022). Xylanase from thermotolerant *Bacillus haynesi* strain, synthesis, characterization, optimization using Box-Behnken Design and biobleaching activity. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03043-6>.

Information about the authors

I.Yu. Evdokimov - acting Deputy Director, Junior Researcher, EC «Prombiotech» Altai State University.

A.N. Irkitova - Candidate of Biological Sciences, Director, Leading Researcher, EC «Prombiotech», Altai State University.

A.V. Malkova - post-graduate student of the Department of Ecology and Biotechnology, junior researcher of the EC «Prombiotech» of the Altai State University.

D.E. Dudnik - post-graduate student of the Department of Ecology and Biotechnology, laboratory assistant-researcher of the EC «Prombiotech» of the Altai State University.

M.V. Shirmanov - Junior Researcher, EC «Prombiotech», Altai State University.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare that there is no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 13.01.2023; одобрена после рецензирования 13.03.2023; принята к публикации 21.03.2023.

The article was received by the editorial board on 13 Jan 2022; approved after editing on 13 Mar 2023; accepted for publication on 21 Mar 2023.