

# Негативное влияние бактерий и микробных биоплёнок в сахарной промышленности



**О. БРАНДШТЕТТЕР**, управляющий партнёр IDEPS GmbH (e-mail: oswald.brandstetter@ideps.at);

**С.В. ГАЦЕНКО** (e-mail: s.hatsenko@ideps.at); **Д.Ю. ТРЕТЬЯКОВ** (e-mail: tretyakov@ideps.at);

**А.В. КОВАЛЬ**, канд. мед. наук (e-mail: alexandrkoval@ideps.at)

IDEPS GmbH

**Т.В. ШЕЙКО**, канд. техн. наук (e-mail: sheiko\_tamila@ukr.net); ORCID ID: 0000-0002-0559-1335

Институт продовольственных ресурсов Национальной академии аграрных наук Украины

## Введение

С момента открытия бактерий в 1676 г. человечество успешно научилось бороться с планктонной формой этих микроорганизмов. Однако более 99 % бактериальных популяций существует в природных экосистемах не в виде свободно плавающих планктонных клеток, а в виде специфически организованных, прикрепленных к субстратам биоплёнок, образование которых представляет собой сложный, строго регулируемый биологический процесс.

Способность формировать биоплёнки является составной частью жизненного цикла большинства микроорганизмов и успешной стратегией защиты бактерий от неблагоприятных факторов среды. Чаще всего биоплёнки образуются микробными сообществами на поверхности раздела фаз: жидкость (водная среда) – твёрдая поверхность, жидкость – воздух, две несмешивающиеся жидкости и твёрдая поверхность – воздух.

Биоплёнки могут быть сформированы как бактериями одного вида, так и сообществами из многих видов бактерий, а иногда включать в себя другие микроорганизмы. По сути биоплёнка – это микробное сообщество, состоящее из микробных клеток, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ (EPS) (рис. 1). Их фенотип изменён по сравнению с одиночными планктонными клетками, а также изменены параметры роста и экспрессии специфических генов.

Устойчивость к биоцидам микроорганизмов, организованных в биоплёнку, – от 100 до 1 тыс. раз выше [1, 3].

Поразительная стойкость микроорганизмов в составе биоплёнок обусловлена наличием экзополимерного вещества – матрикса, на долю которого приходится около 85 % веса всей биоплёнки [4]. Практически матрикс биоплёнки представляет собой экзополимер, обладающий колоссальной биологической

и химической инертностью. Матрикс защищает бактерии в биоплёнке от биоцидных препаратов и неблагоприятных воздействий внешней среды (рН-среды, осмотического шока, высыхания, УФ-облучения, фагоцитоза, высокой температуры и т. п.). Матрикс сорбирует металлы и минералы, растворённые органические вещества, концентрирует ферменты и ростовые факторы. Кроме того, сами бактерии внутри матрикса способны постоянно мутировать и приспосабливаться к условиям внешней среды [2].

## Проблема

На сегодняшний день не существует средства, способного быстро и качественно удалить биоплёнку. Современные направления исследований нацелены на преодоление экстрацеллюлярного слоя биоплёнки. Экзополлимерный матрикс биоплёнки может ограничивать диффузию веществ и связывать антимикробные препараты. Внеклеточные полимерные вещества, составляющие матрикс, являются диффузионным барьером для молекул антимикробных веществ. Показано, что отрицательно заряженные экзополисахариды весьма эффективно защищают клетки биоплёнки от гидрофильных и положительно заряженных антимикробных препаратов.

Действие большинства антимикробных препаратов нацелено на активно делящиеся клетки. Фактически все антимикробные и антибактериальные препараты более эффективны в отношении быстро растущих клеток и слабо эффективны относительно нерастущих микроорганизмов.

Ещё одним из факторов устойчивости биоплёнок может быть появление и размножение в них клеток-персистеров (субпопуляционные резистентные клетки).

Известно, что бактерии в биоплёнках могут обмениваться плазмидами, содержащими гены, ответственные за их резистентность к антибиотикам.

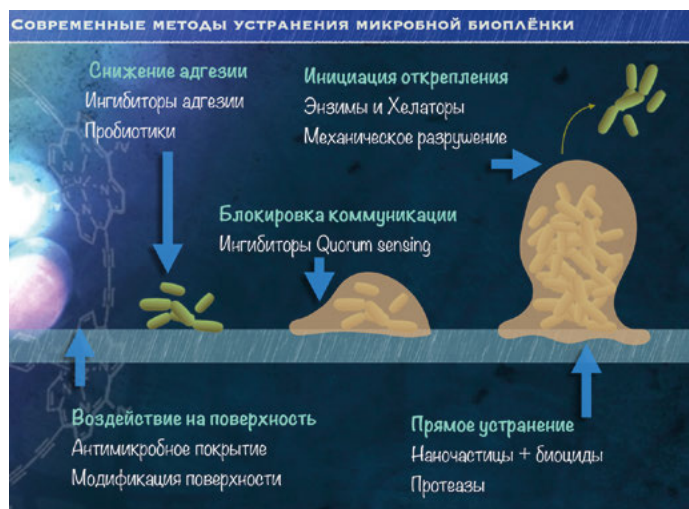


Рис. 1. Структура образования биоплёнки

На данный момент наиболее перспективными представляются следующие направления борьбы с биоплёнками:

- 1) предотвращение первичного инфицирования сред и поверхностей;
- 2) минимизация начальной адгезии микробных клеток;
- 3) разработка методов проникновения через матрикс биоплёнки различных биоцидов с целью подавления активности клеток внутри биоплёнки;
- 4) блокировка синтеза или разрушение матрикса;
- 5) нарушение межклеточного обмена информацией (ингибирование QS-регуляции\*).

Предотвращение первичного инфицирования сред и поверхностей осуществляется за счёт добавления биоцидных препаратов в технологические процессы на различных стадиях производства.

Минимизация адгезии микробных клеток связана с модификацией поверхностей технического оборудования (электрополировка, использование специальных антибактериальных покрытий, лаков, красок) и введением в систему агентов, которые тормозят взаимодействие бактерий с поверхностями (например, гидрофобных веществ, некоторых нейтральных полисахаридов). Следует отметить также, что материал, из которого изготовлена колонизируемая бактериями поверхность, его физико-химические свойства (гидрофильность, электрический заряд, инертность, гладкость) играют важную роль в возможности и скорости образования биоплёнок.

Исследователи предпринимают попытки улучшить проникновение биоцида через матрикс следующими путями: увеличением концентрации биоцида; применением веществ, способствующих проникновению биоцида через матрикс биоплёнки; использованием

\* QS (Quorum Sensing) – особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции.

каналцев биоплёнки для транспортировки биоцида к микроорганизмам, а также наночастиц для проникновения к микроорганизмам, энзимов для частичного разрушения матрикса. Однако ни один из методов не является достаточно эффективным, а некоторые (например, увеличение концентрации биоцида) – опасными для человека и окружающей среды.

#### Новизна разработки

Большая часть используемых в промышленности биоцидов направлена на подавление роста и уничтожение планктонных форм микроорганизмов. В основном механизмы их действия связаны с угнетением дыхания и обменных процессов микроорганизмов, разрывом клеточной мембраны, влиянием на RNA и DNA. Это может быть эффективно в отношении свободных, планктонных форм, но малоэффективно относительно микроорганизмов, организованных в микробные биоплёнки. Стратегии влияния на биоплёнку направлены в основном на облегчение открепления её от поверхности, ослабление структуры матрикса и улучшение проникновения биоцида к микроорганизмам.

В концепцию полученного нами решения было положено то, что в химическом отношении матрикс биоплёнки хотя и является неоднородным и различается в зависимости от микробного состава и окружающих условий, но в целом состоит из полисахаридов. Эта фракция наиболее выражена и может составлять порядка 95 %. Концентрация других химических компонентов в остаточном объёме очень сильно варьирует и может содержать белки, липиды, ДНК, РНК и т. д., однако их содержание в матриксе около 5 %, основной структурной единицей матрикса являются полисахариды.

#### Решение проблемы

Действие препарата IDEPS базируется на первичном разрушении (растворении) экзополимерного матрикса биоплёнки за счёт растворения его полисахаридной части и переводе микроорганизмов из сесильного состояния в планктонную форму при одновременном воздействии на сами микроорганизмы, что позволяет осуществить эффективное уничтожение биоплёнок различного микробного происхождения и различного возраста, а также оказать выраженное биоцидное воздействие на планктонные микроорганизмы (рис. 2).

Механизм растворения полисахаридной части экзополимерного матрикса заключается в способности нашего препарата разрывать 1,4- и 1,6-гликозидные связи молекулы полисахарида и таким образом дробить длинную цепочку полисахарида на моносахариды (рис. 3).

В лабораторных условиях авторами были получены повторяемые модели микробной биоплёнки различного возраста и микробного состава. На этих моделях проведено сравнение эффективности воздействия препарата IDEPS с другими биоцидными препара-



Рис. 2. Действие IDEPS на основные составляющие несахара диффузионного сока

тами. Установлено, что IDEPS вызывал полное растворение микробной биоплёнки и оказал выраженное противомикробное действие, тогда как другие препараты не вызывали полного разрушения и часть микроорганизмов выживала.

Некоторые механизмы действия IDEPS:

- выделение активного кислородного радикала, который разрывает мембрану бактерии. Это особенно эффективно относительно анаэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов (например, SRB-бактерий);
- инициация процессов гликолиза и разрыв полисахаридных цепей по 1,4- и 1,6-гликозидным связям, что приводит к расщеплению полисахаридной части матрикса микробной биоплёнки.

На основании обобщения теоретических и практических проблем сахарной отрасли пищевой промышленности остро стоит вопрос о борьбе с биоплёнкой, которая образуется в ходе микробиологического заражения сырья и полупродуктов сахарного производства. На степень микробиологического заражения влияет качество перерабатываемой свёклы, её химический состав и особенности проведения технологических операций.

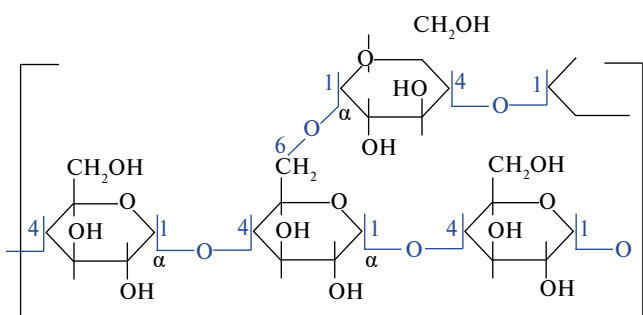


Рис. 3. Структура молекулы полисахарида

Именно активное развитие микрофлоры приводит к неучтённым потерям сахарозы в производстве, обволакиванию технологического оборудования стабильной биоплёнкой, сильному снижению качества полупродуктов производства и, соответственно, к снижению качества готовой продукции.

Микрофлора в диффузионной установке представлена спорообразующими и неспорообразующими бактериями, а также незначительным количеством микромицетов. Однако количественно преобладают спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (*Bac. Subtilis*, *Bac. Mesentericus*, *Bac. Megatherium*, *Bac. Pediculatum*, *Bac. Mycoides*, *Bac. Circulans* и др.). Для их развития оптимальной является температура 37 °С, но некоторые штаммы достаточно активно развиваются при температуре 54–68 °С. Чаще всего в диффузионном соке развиваются термофилы рода *Bac. stearotermophilus*. При нарушениях температурного режима и вынужденной остановке диффузионного аппарата в соке размножаются дрожжи *Saccharomyces*, *Toryla*, *Monilia*, *Candida* и проч.

Наличие спорообразующих бактерий в диффузионном соке способствует образованию инвертного сахара, нитритов и газов, накоплению органических кислот, около 95 % которых составляет молочная кислота. Развиваясь в жёстких условиях процесса диффузии, споровые бактерии приспосабливаются к повышенным температурам.

При переработке свёклы низкого качества, в том числе подмороженной, в диффузионном соке размножаются также молочнокислые бактерии *Leuconostoc*, *Lactobacterium plantarum* и особенно *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*. Из-за размножения слизеобразующих бактерий рода *Leuconostoc* диффузный сок ослизняется, становится вязким, снижается его фильтрационная способность. Клетки этих бактерий устойчивы к повышенным температурам и действию ряда антисептиков, так как образуются микро- и макрокапсулы с многослойными слизистыми чехлами.

Для борьбы с этими микроорганизмами используются специальные химические вещества или их смеси – антисептические препараты.

Антисептические препараты должны отвечать следующим требованиям:

- иметь высокое бактерицидное действие при небольшом распаде и непродолжительном воздействии на объект;
- действовать в невысокой концентрации;
- хорошо растворяться в воде и хорошо смачивать поверхности;
- быть нетоксичными, не загрязнять окружающую среду;
- не усугублять качество полупродуктов и товарного продукта;
- не приводить к коррозии оборудования;
- быть устойчивыми при хранении.

## Характеристики антисептических средств для сахарной промышленности

Антисептики	Преимущества	Недостатки
На основании N, N-диметилдителиокарбамиата натрия	Эффективное действие	Стоимость, резистентность микроорганизмов, не борется с биоплёнкой
На основании смеси надуксусной кислоты и перекиси водорода	Эффективное действие на весь ряд микрофлоры диффузионного сока	Взрывоопасен при хранении и неправильной эксплуатации, агрессивная коррозия металла
На основании гидросульфита аммония и глутарового альдегида	Эффективное действие	Взрывоопасен, токсичен, не борется с биоплёнкой
На основании полигексаметиленгуанидина хлорида	Эффективное действие	Не токсичен, не борется с биоплёнкой
На основании этиленбисдителиокарбамата натрия	Слабое антисептическое действие	Не токсичен, не борется с биоплёнкой
На основании антибиотиков пенициллинового ряда	Активное действие	Резистентность микроорганизмов, влияет на иммунную систему человека
На основании $\alpha$ - и $\beta$ -хмелевых кислот	Слабое действие	Не токсичен, не борется с биоплёнкой
На основании соли монензина натрия	Эффективное действие	Не токсичен, не борется с биоплёнкой
Формалин и его производные	Активное действие	Токсичен (II класс опасности), влияет на иммунную и нервную системы, органы дыхания, вызывает мутагенные и канцерогенные реакции. Полностью не выводится из реакционной зоны, значительная его часть остаётся в конечном продукте

Сейчас на рынке химических веществ предлагается большое количество антисептических препаратов для дезинфекции диффузных установок. Характеристики некоторых из них представлены в таблице.

Негативные свойства некоторых антисептических препаратов:

1) токсичность. Например, формалин полностью не выводится из реакционной зоны, часть его проходит стадии технологического цикла, в какой-то степени разлагаясь при высоких температурах на выпарной станции. Некоторое его количество можно выявить и в конечном продукте;

2) снижение чистоты очищенных продуктов, повышение содержания сахарозы в мелассе;

3) повышение цветности полупродуктов и сахара-песка;

4) повышение содержания солей кальция и мутности полупродуктов.

Переработка свёклы низкого качества приводит к перерасходу дополнительных реагентов (в том числе известнякового камня и энергоносителей) и создаёт проблемы в технологическом процессе, в частности образование устойчивого слоя пены, осложнение работы фильтровального оборудования, инкрустацию нерастворимых солей на поверхности фильтровальной ткани, нарастание содержания солей кальция в полупродуктах, снижение натуральной щёлочности, что, в свою очередь, требует добавления в технологический процесс гидроксида натрия или соды [5–7].

При переработке свёклы часть сахарозы теряется (до 1,0 %), часть накапливается в мелассе (1,6–2,5 % к массе свёклы). Если первый показатель зависит от качества работы завода и технологического оборудо-

вания, то второй – в значительной степени от состава несахаров клеточного сока. Неучтённые потери сахарозы от разложения составляют 0,15–0,40 % от массы сахарной свёклы.

При переработке свёклы подмороженной, поражённой болезнями или микробиологически заражённой возникает необходимость определить и устранить декстран и леван, так как эти полисахара образуются в результате действия микроорганизмов и являются оптически активными, что вносит существенную погрешность в измерения содержания сахарозы.

На сахарных заводах проводят процесс экстракции сахарозы из свекловичной стружки так, что в сыром жоме при выходе из диффузионной установки содержание сахарозы составляет около 0,3 % к массе свёклы. При использовании на производстве жомовых прессов глубокого отжима и возвращения плохо очищенной жомопрессовой воды в диффузионную установку значительно снижается качество диффузионного сока за счёт возврата в процесс значительного количества несахаров, в основном высокомолекулярных соединений.

Также в процессе диффузии имеют место потери сахарозы от разложения вследствие её инвертирования под действием внутренних клеточных ферментов (инвертазы), жизнедеятельности микроорганизмов, продуцирующих кислоты, и кислотного катализа. Нормативные допустимые потери сахарозы от разложения в диффузионной установке составляют 0,15–0,18 % к массе свёклы, но на практике они значительно больше и могут достичь 0,8–1 % к массе свёклы.

Для снижения неучтённых потерь сахарозы и повышения качества полупродуктов сахарного производства опробован препарат широкого спектра действия

на всю контаминирующую микрофлору диффузионного сока, который не вызывает её резистентности, а также разрушает микробиологическую биоплёнку и предотвращает образование новой.

Такой препарат комплексного действия – IDEPS – в 2018–2019 гг. прошёл лабораторные, полупромышленные испытания и показал высокие технологические результаты. В ноябре 2019 г. для подтверждения итогов лабораторных испытаний были проведены промышленные испытания IDEPS на предприятии, сертифицированном по ISO 22000:2005, ISO 45001:2018, ISO 14001:2015, ISO 9001–2015.

### Выводы

По обобщённым результатам лабораторных и промышленных испытаний можно сделать следующие выводы.

1. Установлено положительное действие препарата комплексного действия IDEPS на технологический процесс производства сахара из сахарной свёклы.

2. Выявлено, что препарат комплексного действия IDEPS активно действует на микрофлору диффузионного сока, снижает его кислотность на 75 % в пересчёте на молочную кислоту и разрушает биоплёнку.

3. Исследовано влияние установленной концентрации препарата комплексного действия IDEPS на разрушение пектинового комплекса (на 30 %) и сапонины (на 20 %), который содержится в диффузионном соке. В результате такого разрушения будет наблюдаться снижение вспенивания сока и улучшение процесса фильтрации. Часть сапонины проходит все стадии производства и остаётся в кристаллах сахара, давая положительную реакцию на флок-тест (тест Coca-Cola). В случае его разрушения улучшится качество белого сахара – не будут образовываться хлопья в подкисленных растворах и напитках. Будет получен белый сахар более высокой категории.

4. Добавление препарата комплексного действия IDEPS оказывает выраженный пролонгированный эффект пеногашения.

5. Использование препарата даёт возможность снизить неучтённые потери сахара в свеклоперерабатывающем отделении, за счёт чего увеличится выход сахара.

6. Исследовано действие препарата комплексного действия IDEPS на технологические стадии очистки диффузионного сока и выявлена активная флотация и седиментация образованного кальциевого комплекса.

7. Установлено, что благодаря применению препарата комплексного действия IDEPS можно снизить расходы известкового молока. Это будет способствовать экономии затрат на известковый камень и топливо.

8. При добавлении в технологический процесс вышеназванного препарата наблюдается образование качественной структуры фильтрационного осадка. Зафиксирована высокая скорость отстаивания соков – 1,46 см/мин. Не происходит закупоривания

порфильтовой перегородки. Отмечены высокие фильтрационно-седиментационные свойства сока. При таком течении процесса возможна экономия фильтовальной ткани.

9. Наблюдается повышение качества соков и сиропа. Сироп из такого сока термостабильный с высокими технологическими и органолептическими показателями.

10. Сваренный из такого сиропа утфель будет иметь стабильное качество. Небольшое количество углеводов, кроме чистой сахарозы, позволит получить равномерный кристалл сахара с хорошим гранулометрическим составом.

Препарат комплексного действия IDEPS рекомендуется в целях борьбы с биоплёнкой, дезинфекции жомопрессовой воды, мезголовушек, чанов для хранения диффузионного сока и патоки, для санитарного замыва технологического оборудования.

### Список литературы

1. *Ceri, H.* The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms / H. Ceri [and oth.] // *J Clin Microbiol.* – 1999. – Jun; 37(6):1771-6.
2. *Flemming, H.-C.* Ulrich Szewzyk, Jost Wingender. Biofilm Highlights 5 / H.-C. Flemming, U. Szewzyk, J. Wingender. – Springer Series on Biofilms Book. – 2011. – 256 p.
3. *Jhajharia, K.* Biofilm in endodontics: a review / K. Jhajharia, A. Parolia, K.V. Shetty, L.K. Mehta // *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry.* – 2015/1. – P. 1–5.
4. *McLean, R.J.C.* Training the Biofilm Generation – a Tribute to J.W. Costerton / R.J.C. McLean, J.S. Lam, L.L. Grahamc // *Journal of Bacteriology.* – December 2012. – Vol. 194. – No 24. – P. 6706–6711.
5. *Гусятинська, Н.А.* Ефективність сучасних дезінфектантів при переробленні цукрових буряків, уражених бактеріями роду *Leuconostoc* / Н.А. Гусятинська, Т.М. Нечипор // *Наукові праці НУХТ.* – 2017. – Т. 23. – Вип. 6. – С. 109–206.
6. *Ткаченко, С.В.* Перспективи застосування електрохімічно активованих розчинів у технологічному процесі цукрового виробництва / С.В. Ткаченко [та ін.] // *Цукор України.* – 2015. – Вип. 5. – С. 13–17.
7. *Шейко, Т.В.* Шляхи вирішення проблеми пініння напівпродуктів цукрового виробництва / Т.В. Шейко [та ін.] // *XI Всеукраїнська конференція молодих вчених «Молоді вчені 2020 – від теорії до практики».* 12 березня 2020 р., м. Дніпро, Україна, ISBN 978-617-7433-93-3.

**Аннотация.** Рассмотрена проблема образования микробиологической биоплёнки в процессе получения диффузионного сока в сахарной промышленности. Приведена сравнительная характеристика всех существующих антисептиков. Предложен новый препарат комплексного действия IDEPS, который активно борется с микробиологическим обсеменением диффузионного сока и микробной биоплёнкой, а также оказывает положительное влияние на все последующие технологические процессы. **Ключевые слова:** сахарная промышленность, диффузионный сок, микробиология, биоплёнка, несакхара.

**Summary.** The problem of formation is considered microbiological biofilm in the process of obtaining diffusion juice in the sugar industry. Comparative characteristics of all existing antiseptics. A new drug is proposed An actively struggling IDEPS microbiology of diffusion juice and microbial biofilm and also has a positive impact on all subsequent technological processes.

**Keywords:** sugar industry, diffusion juice, microbiology, biofilm, sugar.