

УДК 579.663

UDC 579.663

ВЛИЯНИЕ ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА КИСЛОТООБРАЗУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ПРОДУЦЕНТА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ LACTOCOCCUS LACTIS CH5

THE INFLUENCE OF GLUCOSE AND YEAST AUTOLYSATE CONCENTRATION AND THE METHOD OF CULTIVATION ON PRODUCTIVITY OF LACTIC ACID PRODUCER LACTOCOCCUS LACTIS CH5

Илушка Игорь Валериевич
соискатель

Igor Valeryevich Ilushka
competitor for degree

Доценко Сергей Павлович
д.х.н., профессор
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Dotsenko Sergei Pavlovich
Dr.Sci.Chem., professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Изучена зависимость скорости роста культуры, увеличения ее биомассы и продуктивности молочнокислого микроорганизма *Lactococcus lactis* CH5 и определены оптимальные условия биосинтеза молочной кислоты от концентрации глюкозы, дрожжевого экстракта и способа культивирования

Particular qualities of growth of homofermentative lactic acid producer *Lactococcus lactis* CH5 depending on the composition nutrient medium: glucose and yeast autolysate concentration are examined in the article. The influence of the method of cultivation on the productivity and the speed of the lactic acid synthesis is analyzed

Ключевые слова: ЛАКТОКОККИ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, БИОСИНТЕЗ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Keywords: LACTOCOCCUS LACTIS, MICROORGANISMS, PRODUCTION OF LACTIC ACID

Молочная кислота широко используется в пищевой промышленности для производства напитков, мармелада, в процессах консервирования [1]. Также ее применяют в кормопроизводстве и в тяжелой промышленности. Молочная кислота хорошо полимеризуется. Спрос на нее вырос в связи с возможностью ее использования в качестве исходного сырья для биоразлагаемых полимеров, оксигенированных веществ, регуляторов роста растений и химических продуктов специального назначения [2]. Микробиологический синтез молочной кислоты гораздо рентабельнее химического [3,4,5]. Продуценты молочной кислоты гомоферментативные молочнокислые бактерии используют в составе пробиотиков для лечения людей и молодняка животных [6].

Важным направлением работ по оптимизации производства молочной кислоты является изучение биологических свойств продуцентов молочнокислого брожения, селекция активных гомоферментативных молоч-

нокислых бактерий, оптимизация параметров управления процессом биосинтеза. Также важным является изучение и применение оптимальных условий роста отобранных культур микроорганизмов и эффективности процесса кислотообразования. [7]. Посредством таких факторов как источники азота и углерода, рН, температура, способ культивирования можно влиять на титр культуры- продуцента молочной кислоты и ее продуктивность [8].

В работе были использованы штаммы молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* CH5, *Lactobacillus helveticus* B-4040, *Lactobacillus delbrueckii* Л 20, полученные из коллекции ВКПМ и выделенные из кисломолочных продуктов Северо-Кавказского региона.

Для культивирования молочнокислых микроорганизмов была использована среда MRS [9]. Источником углерода в среде была глюкоза, источником азота – дрожжевой экстракт. Культивирование проводили в 500 мл колбах, 10-литровом и 100-литровом ферментерах (производство ОАО "ОКБ Фармбиомаш" г.Йошкар-Ола) с использованием датчика температуры ДТС 035-50 М (Россия) и комбинированных стерилизуемых рН-электродов InPro 3030 (Швейцария) при 37° С без аэрации. Заполняемость ферментеров составляла 70% от общего объема, посевная доза – 5% 18-часовой культуры.

Концентрацию биомассы определяли весовым методом, высушивая отмытые клетки навески при 105°С до постоянного веса. Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл или титр) определяли методом 10-кратных разведений пробы и высевом на агаризованную среду MRS. Об общем количестве клеток судили по оптической плотности культуры, измеренной при 590 нм [10,11]. Суспензию клеток предварительно разводили в 50 раз. Оптическую плотность измеряли на КФК-2-УХЛ 4.2 (Россия).

Идентификацию и относительное содержание органических кислот в культуральной жидкости проводили на лабораторном газовом хроматографе Shimadzu (Япония).

Количество молочной кислоты определяли титрованием 0,1 N гидроокисью натрия в неводных растворах (изопропиловом спирте). Потенциометрический анализ основан на титровании до обнаружения точки, при которой потенциал не меняется при дальнейшем добавлении щелочи. Диапазон скачка потенциала для свободной молочной кислоты от 80 до 180 мВ [1]. Разность потенциалов измеряли с помощью электрода ЭСЛК-01.7.

Скорость роста культуры лактококков определяли для стадии экспоненциального роста по отдельным участкам кривой накопления биомассы [13].

Для отбора наиболее перспективного штамма-продуцента молочной кислоты была изучена кислотообразующая способность трех культур молочнокислых бактерий :*Lactococcus lactis* CH5, *Lactobacillus helveticus* В-4040, *Lactobacillus delbrueckii* Л 20. Каждую культуру засеивали в колбы с 200 мл жидкой среды MRS с добавлением 10 г/л дрожжевого экстракта и 25 г/л глюкозы, рН 6,0. Инокулятом служила 18-часовая культура. Изменения рН среды при выращивании исследованных культур молочнокислых бактерий представлены в данных таблице. 1.

Таблица 1. Динамика изменения рН среды при выращивании молочнокислых бактерий

Культуры микроорганизмов	Значения рН		
	6 часов	24 часа	48 часов
<i>Lactococcus lactis</i> CH5	3,71± 0,22	3,56 ± 0,18	3,0 ± 0,21
<i>Lactobacillus helveticus</i> В 4040	5,50 ± 0,18	5,45 ± 0,14	4,30 ± 0,15
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> Л 20	5,03 ± 0,21	4,96 ± 0,17	4,86 ± 0,14

Как видно из таблицы.1, наиболее значительное снижение показателей pH отмечено при росте культуры :*Lactococcus lactis* CH5. Особенно выражен процесс кислотообразования первые 6 часов роста культур, pH культуральной жидкости *L.lactis* CH5 снизилась на 2,29. Далее изменение уровня pH было уже менее выражено.

Изучение спектра образовавшихся органических кислот культуральная жидкость после 24 выращивания штамма *L. lactis* CH5 произвели на лабораторном хроматографе. Результаты показаны на рисунке 1.

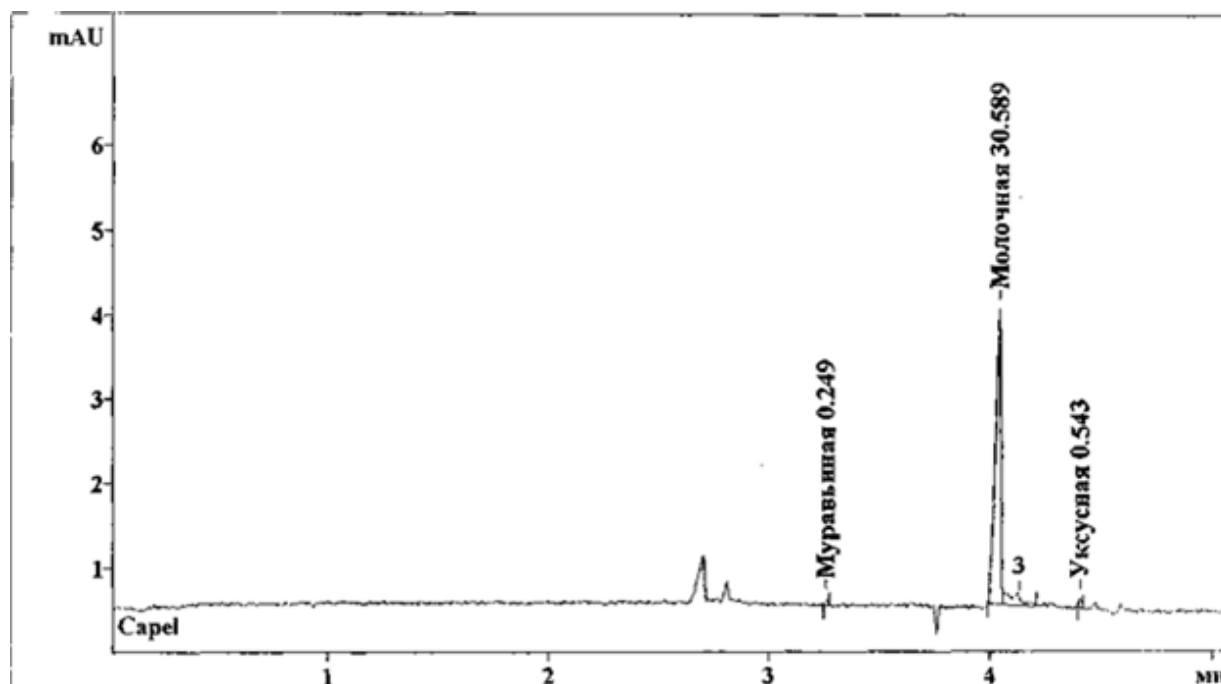


Рисунок 1 - Состав органических кислот в культуральной жидкости при выращивании штамма *L.lactis* CH5.

Из данной хроматограммы видно, что культура *L.lactis* CH5 является возбудителем гомоферментативного молочнокислого брожения, так как более 97% от всех выделяемых органических кислот составляет молочная кислота.

Через 24 и 48 часов измеряли количество молочной кислоты, синтезированной каждым штаммом. Результаты представлены на рисунке 2.

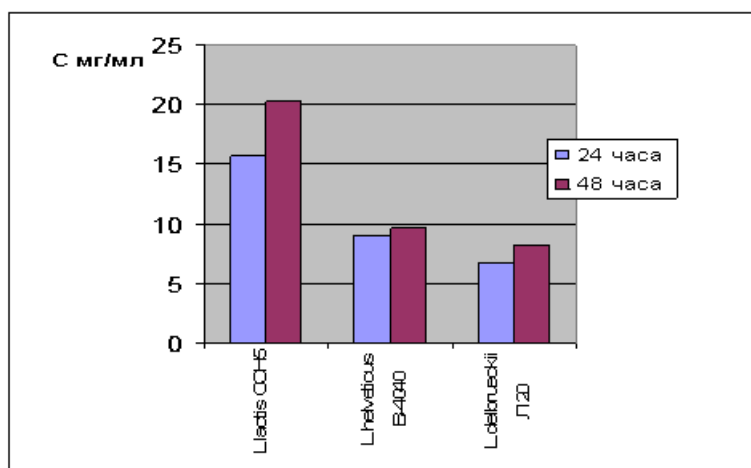


Рисунок 2 - Изменение концентрации молочной кислоты через 24 и 48 часов культивирования трех штаммов молочнокислых бактерий.

Из данных рис.2 видно, что наиболее перспективным продуцентом молочной кислоты является штамм *Lactococcus lactis* CH5. Через двое суток выращивания количество молочной кислоты достигло более 20 мг/мл среды. Продуктивность этой культуры лактококков оказалась в 2 раза выше, чем у использованных в работе лактобацилл. Все дальнейшие исследования проводили с использованием штамма *L.lactis* CH5.

Микроскопическое изучение лактококков CH5 в процессе выращивания и увеличения кислотности среды показало, что исходная культура и в начале культивирования выглядела как цепочки, состоящие из 10-12 кокков. В период логарифмического роста и в стадии стационарной фазе роста, культура *L.lactis* CH5 морфологически выглядела как микрококки или диплококки.

Изменение морфологии расположения клеток относительно друг друга соответствует периоду интенсивного кислотообразования и далее на стадии постепенного отмирания и снижения численности клеток. Возможно, такие морфологические изменения связаны с увеличением кислотности среды.

Для изучения зависимости физиолого-биохимических параметров роста и продуктивности культуры *L.lactis* CH5 от концентрации дрожже-

вого экстракта были использована среда MRS pH 6,0, содержащей 25 г/л глюкозы (таблица 2). Опыт проводили в колбах, инкубация длилась 24 часа при 37° С.

Таблица 2. Зависимость параметров роста культуры *L.lactis* CH5 от концентрации дрожжевого экстракта в среде

Показатель	Концентрация дрожжевого экстракта в среде, г/л			
	5	10	15	20
Титр ($\times 10^7$ клеток/мл)	5.5	7.1	9.0	15
Биомасса (г/л)	14.3	15.9	16.2	16.8
pH	3.82	3.78	3.75	3.54
Количество продуцируемой молочной кислоты (г/л)	13.5	19.8	21.6	21.8

Как видно из результатов, представленных в таблице 2, наиболее подходящей для роста и продуктивности культуры *L.lactis* CH5 оказалась концентрация дрожжевого экстракта 20 г/л среды.

Чтобы проследить, как поведет себя культура *L.lactis* CH5 при увеличении массы обмена, провели культивирование на среде MRS с добавлением 10, 20 и 30 г/л дрожжевого экстракта и 50 г/л глюкозы в 10-литровом ферментере, скорость перемешивания была 280 об./минуту. Каждые полчаса измеряли оптическую плотность жидкой культуры. Изменения скорости роста культуры *L.lactis* CH5 показаны на рисунке 3.

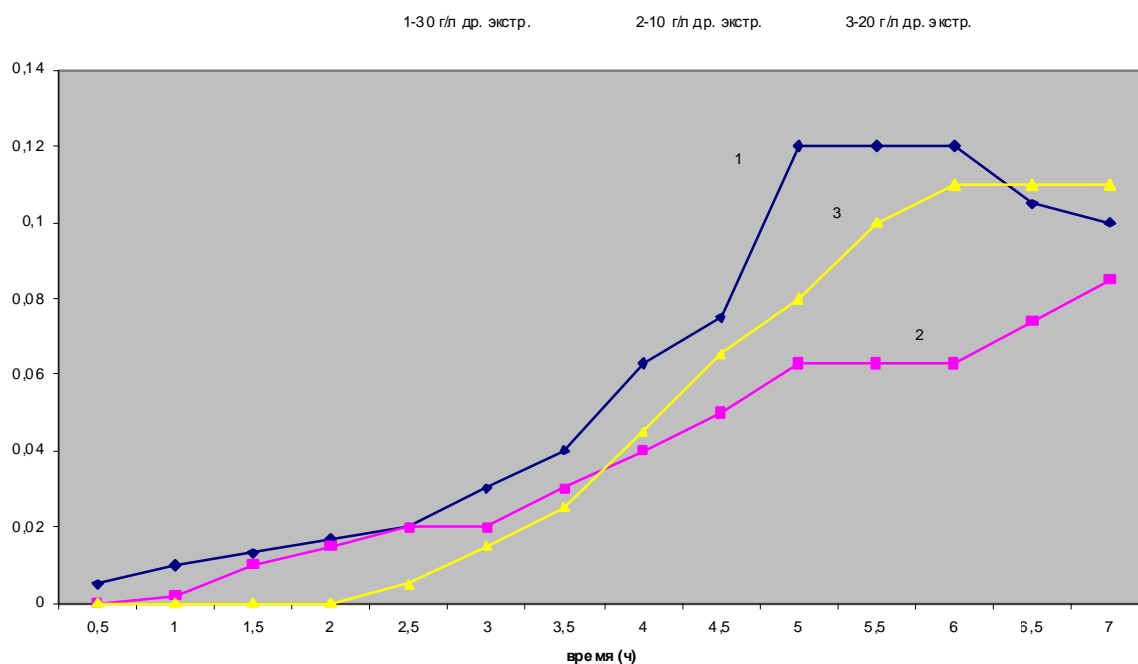


Рисунок 3- Динамика изменения оптической плотности культуры *L.lactis* CH5 в зависимости от концентрации дрожжевого экстракта в среде

Как видно из рисунка 3, при выращивании в 10-литровом ферментере также наиболее оптимальной была среда с содержанием 20 г/л дрожжевого экстракта. Хотя первые два часа роста биомассы не наблюдалось, затем шло постепенное нарастание скорости роста культуры. При таком составе среды стационарная фаза роста наступала через 6 часов после начала культивирования. При концентрации дрожжевого экстракта 10 и 30 г/л стационарная фаза начиналась раньше и количество молочной кислоты синтезировалось меньше, чем при выращивании культуры на среде с 20 г/л дрожжевого экстракта.

Для изучения влияния начальной концентрации глюкозы на продолжительность логарифмической фазы роста культуры *L.lactis* CH5 и ее продуктивности провели ряд опытов по культивированию в 10-литровом ферментере, используя среду MRS с добавлением 20 г/л дрожжевого экстракта. Начальную концентрацию глюкозы использовали от 10 до 115 г/л

(таблица 3). Время ферментации соответствовало выходу в стационарную фазу роста культуры.

Таблица 3. Влияние концентрации глюкозы в среде на биосинтез молочной кислоты культурой *L.lactis* CH5

Начальная концентрация глюкозы (г/л)	Время ферментации (час)	Количество биомассы (г/л)	Средняя скорость роста биомассы	Количество молочной кислоты (г/л)
10	2	2,5	4,5	0
25	4	4,8	1,45	20
50	6	6,7	0,53	40
80	10,5	8,5	0,19	68
115	18	13	0,09	90

Максимальная скорость роста биомассы наблюдалась при концентрации глюкозы 10 г/л, однако рост численности лактококков прекратился через 2 часа. Из данных таблицы 3 видно, что продолжительность логарифмической фазы, когда происходит биосинтез молочной кислоты, и количество синтезированной кислоты прямо пропорционально начальной концентрации глюкозы. Однако, если посчитать среднюю скорость синтеза молочной кислоты за час ферментации, то наиболее целесообразно оказывается исходная концентрация глюкозы в среде 50 г/л (рисунок 4).

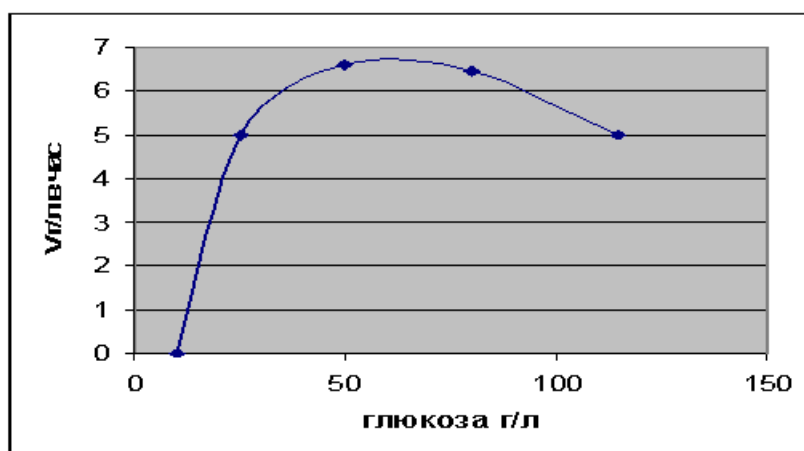


Рисунок 4 - Зависимость скорости синтеза молочной кислоты от концентрации глюкозы в среде

Как видно из рисунка 4, средняя скорость синтеза молочной кислоты при концентрации глюкозы 25 г/л и 115 г/л одинаковая, а максимальная скорость наблюдалась при начальной концентрации глюкозы в среде 50 г/л.

Далее был проведен опыт по культивированию продуцента *L.lactis* CH5 на среде MRS с добавлением 20 г/л дрожжевого экстракта и 50 г/л глюкозы в 100-литровом ферментере. Кривая роста культуры представлена на рисунке 5.

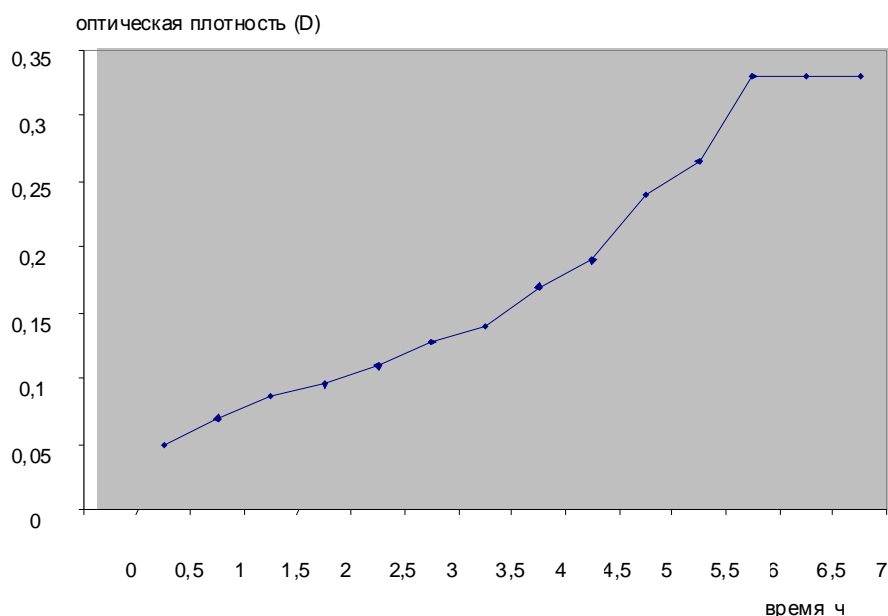


Рис.5 Изменение оптической плотности культуры *L.lactis* CH5 при выращивании в 100-литровом ферментере

Можно отметить, что при увеличении массы обмена, культура несколько меняет показатели роста. Так, в 10-литровом ферментере экспоненциальная фаза роста и синтез молочной кислоты начинался после 2 часов культивирования. В 100-литровом ферментере логарифмическая фаза начиналась уже через 20-30 минут после начала культивирования и оптическая плотность достигала 0,35, в отличие от 0,11 – при выращивании в 10-литровом ферментере.

Обобщая полученные нами результаты, можно сказать, что культура *L.lactis* CH5 является перспективным продуцентом молочной кислоты. Она

имеет значительную толерантность к низким рН, обладает высокой скоростью роста и продуктивностью. Наилучшие показатели скорости роста биомассы и синтеза молочной кислоты были получены нами на среде MRS с добавлением 50 г/л глюкозы и 20 г/л дрожжевого автолизата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Микроэкологические аспекты функционального питания /Медицинские аспекты микробной экологии.М.,1994.С.10-20.
2. Datta R. et al. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivative//FEMS Microbiology Reviews.1995.Vol.16.P.221-231.
3. Тренина М.А., Лысенко А.М., Ахвередян В.З., Мчедлишвили Е.Б. Изучение видовой вариабельности бактерий *Lactococcus lactis* по признаку адаптации к высокой кислотности среды.// Микробиология. 2006.Т.75.№1.С.118-126.
4. Duwat P., Cesselin B., Souris S.,Gruss A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival//J.Food Microbiol.2000.Vol.55.P.83-86.
5. Sjoberg A.,Persson I.,Quednau M.,Hahn-Hagerdal B. The influence of limited and non-limited growth conditions on glucose and maltose metabolism in *Lactococcus lactis* ssp.lactis strains//Appl.Microbiol.fnd Biotechnol.1995.Vol.42.№6.P.931-938.
6. Ганина В.И. Стабильные закваски – качественные и безопасные молочные продукты//Молочная промышленность.1999.№8.С.25-27.
7. Куксова Е.В. разработка технологии комплексных пищевых добавок с использованием кислотообразующих бактерий: автореф.... дис. канд. техн. наук М.2008.27 с.
8. Warminska-Radyko I., Olszewska M.,Mikš-Krajnik M. Effect of temperature and sodium chloride on growth and metabolism of *Lactococcus* strains in long-term incubation of milk //Milchwissenschaft-Milk Science International.2010.Vol.65.P. 32-35.
9. Аркадьева З.А. и др. Промышленная микробиология. М.,1989. 686 с.
10. Варфаломеев С.Д. Кинетические закономерности развития микробных популяций /Современные проблемы биокинетика. М.,1987. С.6-77.
11. Миневич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов.М.,2005. 353 с.
12. Проскуряков М.Т.Биохимия. Краснодар,2007.199 с.
13. Гуревич Ю.Л. Устойчивость и регуляция в микробных популяциях. Новосибирск, 1984. 98 с.