

М.Ж.Каирова

РГП «Национальный центр биотехнологии КН МОН РК», Астана
(E-mail: markaigai@mail.ru)

Изучение способности молочнокислых бактерий утилизировать побочный продукт пивоваренного производства

Установлено, что исследуемые бактериальные штаммы хорошо растут на среде с водной вытяжкой зерноотходов, причем при использовании 100 %-ного экстракта титр клеток был выше в два и более раз. Отмечено, что штаммы молочнокислых бактерий способны продуцировать *L*-молочную кислоту в концентрации 4,3–5,0 мМ. Доказано, что высокую активность показал штамм 0025 RKM, который образовал 5,5 мМ *L*-молочной кислоты.

Ключевые слова: молочная кислота, молочнокислые бактерии, побочные продукты, штаммы-продуценты, идентификация.

Химическая индустрия на основе нефти выпускает гигантский ассортимент продукции, в том числе и бытового назначения. В частности, невозобновляемые запасы нефти расходуются на производство таких изделий, как пластиковая пленка, пластмассовые бутылки и пакеты, которые практически не поддаются биологическому разложению. В качестве конкурента пластику, произведенному из нефтепродуктов, выступает восстанавливаемый и биodeградируемый пластик, производимый из полилактата (polylactic acid — PLA) — продукта конденсации молочной кислоты [1].

Основной рынок использования молочной кислоты (МК) — это пищевая, фармацевтическая и косметическая промышленность, однако в связи с множеством перспектив в применении полилактата ожидается значительное увеличение его потребления. Так, в 2008 г. производственный объем составил 260 тыс. тонн 100 %-ной молочной кислоты для традиционного рынка использования (включая PLA), в 2010 г. сделан прогноз на более чем 1 млн тонн его ежегодного производства [2].

В большинстве случаев для производства полимолочной кислоты (PLA) более пригоден *L*(+)-изомер молочной кислоты (*L*-МК), более чем 95 % промышленного производства которой основывается на процессе микробной ферментации. Молочнокислые бактерии имеют преимущества в целях селективного получения *D*(-) и *L*(+)-изомеров МК из-за их высокой кислотоустойчивости и возможности проведения генетических манипуляций, но обладают такой отрицательной чертой, как требование богатой питательной среды, что усложняет получение кислоты при неполной или незначительной утилизации пентоз [3].

Для уменьшения затрат, связанных с производством молочной кислоты, разработан штамм *Escherichia coli* SZ85, продуцирующий *L*-МК на минеральной среде и имеющий замену части кодирующего хромосомального участка *ldhA* на ген *ldhL*, кодирующий *L*-лактат дегидрогеназу [4, 5]. Кроме молочнокислых бактерий для промышленного производства лактата используются и другие бактерии (*Bacillus coagulans*), а также мицелиальные грибы (*Rhizopus spp.*), метаболически реконструированные дрожжи и цианобактерии [6, 7].

На себестоимость производства молочной кислоты в значительной степени влияет стоимость сырого продукта. Для биологического производства молочной кислоты дорогостоящим является использование моносахаров, таких как глюкозы, сахарозы и т.д., хотя это обеспечивает ее высокую чистоту. Использование же отходов и вторичных ресурсов перерабатывающих отраслей промышленности позволяет удешевить производство молочной кислоты в сравнении с определенными сахарами.

При ферментации на питательной среде, содержащей молочную сыворотку, высокопродуктивный продуцент *L*(+)-молочной кислоты штамм *Enterococcus faecium* В-2240 D позволяет получать целевой продукт с весьма низкой себестоимостью, выходом до 95 % и оптической чистотой до 99,8 % [8]. Известно, что использование кокковых форм молочнокислых бактерий [9–13] для производства молочной кислоты представляется предпочтительным в связи с тем, что они обладают большей скоростью роста, обеспечивающей, следовательно, ускорение накопления молочной кислоты в культуральной жидкости и сокращение производственного цикла.

В целом высокая стоимость и ограниченные запасы ископаемого топлива вызывают большой интерес к использованию восстанавливаемых источников для производства этанола, молочной ки-

слоты и других химических веществ. Производство МК имеет огромное значение в различных отраслях промышленности, например, для получения биodeградируемого растворителя этиллактата, который применяется при производстве электротехники, лаков и красок, текстиля, смазок, клеев и т.д. Производные молочной кислоты являются нетоксичными и не оказывают негативного влияния на окружающую среду в сравнении с нефтепродуктами. Среди европейских стран рынок молочной кислоты наиболее развит в Германии (29,3 % по оценкам 2008 г.), далее следуют Франция и Италия. Самый крупный производитель биоразлагаемого L-PLA — американская компания NatureWorks LLC (140 000 тонн/год) [14]. Кроме того, PLA производится компанией Toyota (Япония), Hitachi (Япония), Dupont (США), Galactic (Бельгия), Hisun Biomaterials (Китай), а основной производитель L,D-полилактата — компания PURAC (Нидерланды) [15]. В настоящее время единственным в России предприятием по производству молочной кислоты (lactic acid) является ООО «Сухой крахмал и молочная кислота» (ООО «СКИМК») [16], в Республике Казахстан таких предприятий нет.

Таким образом, для обеспечения отечественного рынка молочной кислотой, используемой не только при производстве косметики, пищевых продуктов, в фармацевтической отрасли, но и в сельскохозяйственной промышленности, актуальным и перспективным является разработка технологий получения молочной кислоты на основе возобновляемого сырья.

Цель данных исследований — изучение способности штаммов молочнокислых бактерий расти на среде, основанной на водной вытяжке побочных продуктов пищевого производства, а также определение концентрации молочной кислоты, продуцируемой различными штаммами.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования были депонированные в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» штаммы молочнокислых бактерий, а также пробы пивной дробины, любезно предоставленные частной пивоварней «Пивоварофф» (г. Астана).

Оценку чистоты бактериальных штаммов осуществляли согласно методам классической микробиологии [17, 18]. Общеизвестный метод идентификации бактерий в основном ориентирован на использовании определителя «Bergey Manual of Systematic Bacteriology» [19].

Активность кислотообразования бактериальных штаммов определяли титриметрическим методом [20]. Количественное определение содержания L-молочной кислоты проведено с использованием коммерческого набора фирмы Абкам (США) и спектрофотометра фирмы Биорад (США).

Для выделения ДНК бактериальных культур использован коммерчески доступный набор Wizard Genomic DNA Purification Kit 500 (Promega, USA). Выделение ДНК, агарозный гель-электрофорез, ПЦР-метод выполнены согласно общеизвестным методам [21]. Для определения нуклеотидной последовательности гена 16S rDNA проводили ПЦР с использованием праймеров 8f (5'-AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3') и 806r (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3'), которые являются универсальными для бактерий.

В целях получения достоверных данных все эксперименты проводили в 2–4-кратной повторности, результаты обрабатывались общепринятыми статистическими методами [22].

Результаты исследований

Проведен отбор штаммов, относящихся к различным видам молочнокислых бактерий, и изучена их способность расти на среде, основа которой состоит из побочного продукта пивоваренного производства, в частности, из водной вытяжки зерновой дробины. Так, в таблице представлены результаты изменения количества КОЕ (колониеобразующих единиц) штаммов молочнокислых бактерий при их культивировании на среде с побочными продуктами пивного производства. При этом для определения оптимальных условий роста молочнокислых бактерий на водной вытяжке зерноотхода была использована среда с двукратно разведенным экстрактом (50 %) и без разведения (100 %). Учитывая, что исходная вытяжка пивной дробины содержит незначительное количество (до 0,115 %) восстанавливающих сахаров, то дополнительно в среду добавлен 1 % глюкозы. Установлено, что штаммы молочнокислых бактерий хорошо растут на среде с водной вытяжкой зерноотходов, причем титр клеток бактерий был выше в два и более раза при использовании неразведенной 100 %-ной вытяжки побочного продукта.

**Определение титра клеток молочнокислых бактерий
при культивировании на среде с побочными продуктами**

Наименование штамма	КОЕ/мл 50 % среды	КОЕ/мл 100 % среды
0012 RKM	$1,35 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
0014 RKM	$1,80 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
0015 RKM	$1,80 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$
0023 RKM	$1,80 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$

Как известно, активное кислотообразование бактерий рассматривается как один из важных факторов их антагонизма в отношении других видов микроорганизмов. Поэтому наиболее известным биологическим свойством молочнокислых бактерий, в том числе лактобацилл, является их способность продуцировать молочную кислоту.

При изучении кислотообразующей активности по методу Тернера молочнокислые бактерии условно подразделяют на три группы: 1 группа — с низкой кислотообразующей активностью до 40 °Т (градусов по Тернеру), 2 группа — со средней кислотообразующей активностью 40–79 °Т, 3 группа — с высокой активностью — от 80 °Т и выше [17, 18]. Результаты определения титруемой кислотности у исследуемых молочнокислых бактерий показали, что все исследуемые штаммы молочнокислых бактерий обладают высокой кислотообразующей активностью и уровень кислотообразования был в пределах 130–270 °Т.

В связи с тем, что метод Тернера позволяет определять накопление не только молочной кислоты в среде, но и других органических кислот, продуцируемых бактериями, проведено количественное определение молочной кислоты с помощью коммерчески доступного набора фирмы Абкам (США). Для определения уровня содержания молочной кислоты был построен калибровочный график (рис. 1) с использованием стандарта молочной кислоты фирмы Абкам (США).

После двухсуточного культивирования исследуемых штаммов молочнокислых бактерий на MRS бульоне проведено определение концентрации молочной кислоты в культуральной жидкости согласно протоколу фирмы-производителя Абкам.

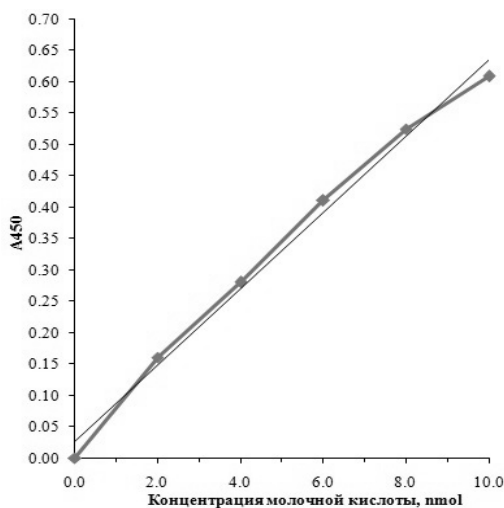


Рисунок 1. Калибровочная кривая определения концентрации молочной кислоты

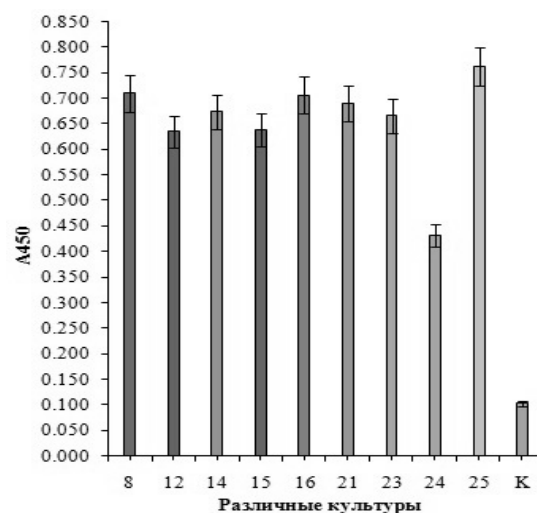


Рисунок 2. Определение оптической плотности реакционной смеси с добавлением супернатанта, полученного с различными штаммами молочнокислых бактерий

На рисунке 2 показано изменение показателя оптической плотности реакционной смеси с добавлением супернатанта, полученного с различными культурами молочнокислых бактерий. При перерасчете в соответствии с калибровочной кривой установлено, что штаммы 0008 RKM, 0016 RKM, 0021 RKM и 0025 RKM способны продуцировать *L*-молочную кислоту в концентрации 10 и более наномоль/лунку, в сравнении со штаммами 0012 RKM, 0014 RKM, 0015 RKM, 0023 RKM и 0024 RKM. При этом контрольный вариант неинокулированной питательной среды (К) показал незначи-

тельное изменение уровня адсорбции, что обусловлено бэкграундом самой питательной среды. Поэтому согласно инструкции фирмы-производителя данного колориметрического набора (Абкам, США) проведен вычет показаний контрольного варианта. В результате проведенных расчетов выявлена способность штаммов 0008 RKM, 0016 RKM, 0021 RKM продуцировать *L*-молочную кислоту в концентрации 4,7–5,0 мМ, тогда как высокую активность показал штамм 0025 RKM (5,5 мМ). У остальных исследованных штаммов молочнокислых бактерий выход молочной кислоты был в пределах от 4,3 до 4,6 мМ, а штамм 0024 RKM характеризовался низкой продуцирующей активностью с выходом молочной кислоты 2,5 мМ на литр питательной среды, что обусловлено слабым ростом данной культуры на жидкой питательной среде MRS.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена *l6S rDNA* исследуемых штаммов молочнокислых бактерий показал 99–100 %-ную идентичность с нуклеотидными последовательностями штаммов, относящихся к роду *Lactobacillus* spp., депонированными в международной базе данных GenBank.

Таким образом, в данной серии экспериментов установлено, что различные штаммы молочнокислых бактерий, являющихся известными продуцентами молочной кислоты, могут утилизировать отходы пивоваренного производства. Дальнейшая оптимизация условий культивирования позволит повысить активность исследуемых штаммов-продуцентов, способных вырабатывать молочную кислоту в пределах 2,5–5,5 мМ на стандартной питательной среде MRS. Как известно, использование органических отходов, повсеместно образующихся в пищевой и перерабатывающей промышленности Казахстана, позволит не только обеспечить удаление источников загрязнения окружающей среды, но и обусловит превращение этих отходов в полезные целевые продукты, в частности для получения молочной кислоты.

Список литературы

- 1 Abdel-Rahmana M.A., Tashiroc Y., Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits // Journal of Biotechnology. — 2011. — Vol. 156. — P. 286–301.
- 2 Taskila S., Ojamo H. The current status and future expectations in industrial production of lactic acid by lactic acid bacteria // Lactic acid bacteria — R & D for food, health and livestock purposes / Ed. by M.Kongo. — Rijeka, Croatia: InTech, 2013. — P. 615–632.
- 3 de Vos W.M. Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice // Microb. Cell Fact. — 2011. — Vol. 10, No. 1–2. — P. 1–13.
- 4 Zhou S., Causey T.B., Hasona A., Shanmugam K.T., Ingram L.O. Production of Optically Pure D-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically Engineered Escherichia coli W3110 // Appl. and environ. microbiol. — 2003. — Vol. 69, No. 1. — P. 399–407.
- 5 Zhou S., Shanmugam K.T., Ingram L.O. Functional Replacement of the Escherichia coli D(–)-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhA*) with the L(+)-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici* // App. and environ. microbiol. — 2003. Vol. 69, No. 4. — P. 2237–2244.
- 6 Patel M.A. Ou M.S., Harbrucker R., Aldrich H.C., Buszko M.L., Ingram L.O., Shanmugam K.T. Isolation and Characterization of Acid-Tolerant, Thermophilic Bacteria for Effective Fermentation of Biomass-Derived Sugars to Lactic Acid // Appl. and environ. microbiology. — 2006. — Vol. 72, No. 5. — P. 3228–3235.
- 7 Yang X. Lai Zh., Lai Ch., Zhu M., Li Sh., Wang J., Wang X. Efficient production of L-lactic acid by an engineered Thermoanaerobacterium aotearoense with broad substrate specificity // Biotechnology for Biofuels. — 2013. — Vol. 6, No. 124. — P. 1–12.
- 8 Skory Ch.D. Isolation and Expression of Lactate Dehydrogenase Genes from *Rhizopus oryzae* // Applied and environm. microbiol. — 2000. — Vol. 66, No 6. — P. 2343–2348.
- 9 Ilmen M., Koivuranta K., Ruohonen L., Suominen P., Penttila M. Efficient Production of L-Lactic Acid from Xylose by *Pichia stipitis* // Appl. and environ. microbiology. — 2007. — Vol. 73, No. 1. — P. 117–123.
- 10 Varman A.M., Yu Y., You L., Tang Y.J. Photoautotrophic production of D-lactic acid in an engineered cyanobacterium // Microbial Cell Factories. — 2013. — Vol. 12, No. 117. — P. 1–8.
- 11 Пат. 2205216 Российская Федерация, МПК7 C12N001/20 C12P007/56 C12N001/20 C12R001/01. Штамм бактерий *Enterococcus faecium* в-2240d — продуцент оптически чистой L(+)-молочной кислоты и промышленный способ получения L(+)-молочной кислоты или ее солей / Галкина Г.В., Илларионова В.И.; заявитель и патентообладатель Морозов Василий Юрьевич. № 2000125372/13; заявл. 05.12.00; опубл. 27.05.2003, Бюл. № 3. 22 с.
- 12 Carvalho A.L., Cardoso F.S., Bohn A., Neves A.R., Santos H. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance // Appl. Environ. Microbiol. — 2011. — Vol. 77, No. 12. — P. 4189–4199.
- 13 Guo T., Kong J., Zhang L., Zhang Ch., Hu Sh. Fine Tuning of the Lactate and Diacetyl Production through Promoter Engineering in *Lactococcus lactis* // Plos one. — 2012. — Vol. 7, Issue 4. — e36296 [Электронный ресурс]
- 14 Vink E.T.H., Davies S., Kolstad J.J. The eco-profile for current Ingeo polylactide production // Industrial Biotechnology. — 2010. — Vol. 6, No. 4. — P. 212–224.
- 15 [ЭР]: <http://www.corbion.com>

16 [ЭР]: <http://www.skimk.ru>

17 Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И.Нетрусов, М.А.Егорова, Л.М.Захарчук и др.; Под ред. А.И.Нетрусова. — М.: Изд. центр «Академия», 2005. — 608 с.

18 Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов / Е.З.Теппер, В.К.Шильникова, Г.И.Переверзева; Под ред. В.К.Шильниковой. — М.: Дрофа, 2004. — 256 с.

19 Хоулт Дж., Криг Н. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. — М.: Мир, 1997. — Т. 1. — 432 с.; Т. 2. — 368 с.

20 Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учеб. пособие / М.Н.Пименова, Н.Н.Гречушкина, Л.Г.Азова, А.И.Нетрусов и др.; Под ред. Н.С.Егорова. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.

21 Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. — N.Y., 1989. — 1659 p.

22 Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

М.Ж.Қайырова

Сыра ашыту өндірісінің қалдық өнімін сүт қышқылы бактерияларының жою қабілетін зерттеу

Мақалада зерттелінетін штаммдар астық қалдықтарының сулы ерітіндісі бар қоректік ортада жақсы өсетіні анықталды, оның үстіне 100 %-дық экстрактыны пайдалану кезінде бактериялар титрі екі есе көп болды. Сүт қышқылы бактерияларының штаммдары 4,3–5,0 мМ концентрацияда *L*-сүт қышқылын өндіруге қабілетті екені көрсетілді. Штамм 0025 RKM жоғарғы белсенділікке ие, ол 5,5 мМ *L*-сүт қышқылын өндірді.

M.Zh.Kairova

Studying of capability of lactic acid bacteria to utilize a grain shot from brewing industry

It is shown that studied strains could grow on a medium with aqueous extract of the grain shot and a titer of bacterial cells was higher in two times on the medium with 100 % of aqueous extract. Strains of lactic acid bacteria are produced *L*-lactic acid in 4,3–5,0 мМ of concentrations. 0025 RKM strain had high activity and can produce 5,5 мМ of concentration of *L*-lactic acid.

References

- 1 Abdel-Rahmana M.A., Tashiroc Y., Sonomoto K. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156, p. 286–301.
- 2 Taskila S., Ojamo H. *Lactic acid bacteria — R & D for food, health and livestock purposes*, Ed. by M.Kongo, Rijeka, Croatia: InTech; 2013, p. 615–632.
- 3 de Vos W.M. *Microb. Cell Fact.*, 2011, 10, 1; 2, p. 1–13.
- 4 Zhou S., Causey T.B., Hasona A., Shanmugam K.T., Ingram L.O. *Appl. and environ. microbiol.*, 2003, 69, 1, p. 399–407.
- 5 Zhou S., Shanmugam K.T., Ingram L.O. *App. and environ. microbiol.*, 2003, 69, 4, p. 2237–2244.
- 6 Patel M.A. Ou M.S., Harbrucker R., Aldrich H.C., Buszko M.L., Ingram L.O., Shanmugam K.T. *Appl. and environ. microbiol.*, 2006, 72, 5, p. 3228–3235.
- 7 Yang X. Lai Zh., Lai Ch., Zhu M., Li Sh., Wang J., Wang X. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6, 124, p. 1–12.
- 8 Skory Ch.D. *Applied and environm. microbiol.*, 2000, 66, 6, p. 2343–2348.
- 9 Ilmen M., Koivuranta K., Ruohonen L., Suominen P., Penttila M. *Applied and environ. microbiol.*, 2007, 73, 1, p. 117–123.
- 10 Varman A.M., Yu Y., You L., Tang Y.J. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12, 117, p. 1–8.
- 11 Patent. 2205216 Russian Federation, МПК7 C12N001/20 C12P007/56 C12N001/20 C12R001/01. Bacterial strain *Enterococcus faecium* v-2240d — producer of optical clear L(+)-lactic acid and industrial technology for obtaining of L(+)-lactic acid and its salts / Galkina G.V., Illarionova V.I.; Morozov Vasilyi Yurievich is applier and patent-owner. № 2000125372/13; application 05.12.00; publication 27.05.2003, Bull. № 3, p. 22.
- 12 Carvalho A.L., Cardoso F.S., Bohn A., Neves A.R., Santos H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 12, p. 4189–4199.
- 13 Guo T., Kong J., Zhang L., Zhang Ch., Hu Sh. *Plos one*, 2012, 7, 4, e36296 [Internet source]
- 14 Vink E.T.H., Davies S., Kolstad J.J. *Industrial Biotechnology*, 2010, 6, 4, p. 212–224.
- 15 <http://www.corbion.com>
- 16 <http://www.skimk.ru>

- 17 Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. et al. *Praktikum for microbiology*: School-book for students of colleges, Ed. A.I.Netrusov, Moscow: Publication center of «Academia», 2005, p. 608.
- 18 Tepper E.Z., Shilnikova V.K., Pereverzeva G.I. *Praktikum for microbiology*: School-book for students of colleges, Ed. V.K.Shilnikova, Moscow: Drofa, 2004, p. 256.
- 19 Holt J.G., Krieg N.R. *Bergey's Manual for bacteria*, In 2 vol., Moscow: Mir, 1997, 1, p. 432; 2, p. 368.
- 20 Pimenova M.N., Grechushkina N.N., Azova L.G., Netrusov A.I. et al. *Manual of practical training for microbiology*: School-book, Ed. N.C.Egorov, Moscow: MGU Publ., 1995, p. 224.
- 21 Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, N.Y., 1989, 1659 p.
- 22 Lakin G.F. *Biometry*: School-book for biological specialties of colleges, 4th ed., Moscow: Vysshaya shkola, 1990, p. 352.