С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің **Ғылым Жаршысы//** **Вестник Науки** Казахского агротехнического университета имени С. Сейфуллина. - 2016. – **№ 3(90).** - С.4-9

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К СИНТЕЗУ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

К.А. Кулжанова, А.А. Абдрашитов,
Д.Б. Канаев, Л.Ж. Бижанова, А.А. Курманбаев

Аннотация

Из различных молочных продуктов и зерна пшеницы было выделено 27 изолятов молочнокислых бактерий. Было отобрано 12 перспективных штаммов молочнокислых бактерий, из которых для дальнейшей работы оставлены 5 штаммов с высоким кислотообразованием: С-3, КФ-1, ТВ-2, ТВ-3 и ТВ-4. Штаммы ТВ-3 и ТВ-4 проявили высокую продуцирующую способность более 200 градусов по Тернеру при ферментации на среде MRS с лактозой.

Ключевые слова: молочная кислота, лактоза, глюкоза.

Молочная кислота в последние несколько лет занимает ведущие позиции на рынке за счет ее использования в непищевой промышленности, в частности, косметологии, фармацевтике, производстве разлагаемого пластика. Устойчивый рост производства молочной кислоты обусловливает интенсивность научного поиска в области повышения эффективности биопродуцентов, разработок технологий по биоконверсии всевозможных органических отходов. Невозобновляемость нефтяных ресурсов также влияет на динамику спроса на данное соединение в мировом масштабе, особенно на фоне обращения производителей к зеленым технологиям [[i], [ii]].

Значительный спрос на молочную кислоту в последнее время обусловлен тем, что она может быть использована в качестве исходного материала для производства полимолочной кислоты (PLA - polylactic acid). Полимолочная кислота (PLA) представляет из себя жёсткий термопластический полимер, который используется в медицине и является биоразлагаемым

пластиком. PLA может заменить синтетические пластики, полученные от нефтяного сырья [iii]. Биополимеры по своим характеристикам не уступают, а подчас даже превосходят традиционные пластмассы. В условиях компостирования биополимеры полностью разлагаются на такие безвредные компоненты, как вода, углекислый газ и гумус, которые естественным образом участвуют в природном цикле [iv].

В природе, молочная кислота встречается в виде двух оптических изомеров, D и L - молочной кислоты. L - молочная кислота является важнейшим изомером в пищевой промышленности и фармацевтике, потому что только в этой форме она усваивается организмом человека. Молочная кислота в форме чистых изомеров более ценна для разных конкретных приложений [v]. Сополимеризация D и L - изомеров приводит к получению некачественного аморфного материала, в то время как гомополимеры образуют регулярные структуры и находятся в кристаллической фазе [vi].

Микробиологический синтез молочной кислоты гомоферментативными молочнокислыми бактериями гораздо рентабельнее химического. В результате химического синтеза получается рацемизированная DL-молочная кислота, а не оптически чистые изомеры. Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически только одну молочную кислоту, она составляет не менее 90% всех продуктов брожения. Некоторые виды молочнокислых бактерий содержат только D-лактатдегидрогеназу и поэтому образуют D-изомер молочной кислоты; другие содержат только L-лактатдегидрогеназу и образуют L-изомер. У определенных видов имеются две лактатдегидрогеназы разной стереоспецифичности, что приводит к образованию рацемической смеси молочной кислоты. Микробная ферментация соответствующими микроорганизмами стала основным способом производства молочной кислоты благодаря экологичности, низкой температуре производства, низкому энергопотреблению и высокой чистоте продукта [vii].

Таким образом, поиск биопродуцентов молочной кислоты и получение молочной кислоты на основе отходов и вторичных ресурсов пищевой промышленности Казахстана является весьма актуальной.

Материалы и методы исследований

В работе использовались классические методы микробиологических исследований. Чистые культуры микроорганизмов выделяли методом накопительных культур [viii].

Сахаролитическая активность выделенных изолятов определялась на дифференциально-диагностической среде Гисса («пестрый ряд»), где в качестве единственного источника углерода являлся один из восстанавливающих сахаров: лактоза и глюкоза [ix].

Культивирование и хранение выделенных изолятов проводили на жидкой и твердой средах MRS (de Mann, Rogosa, Sharpe) глубинным и поверхностным способом. Способность микроорганизмов продуцировать молочную кислоту определяли по изменению pH среды культивирования (pH метр Consort C932, Бельгия), активность кислотообразования определяли по титруемой кислотности по Тернеру [x].

Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств отобранных изолятов проводили, используя стандартные микробиологические методы [xi, xii].

В целях получения достоверных данных все эксперименты проводились в 3-4-х повторностях, далее результаты обрабатывались общепринятыми статистическими методами [xiii].

Результаты исследований и их обсуждение

Источниками выделения микроорганизмов были молочные продукты домашнего приготовления. Были выделены 27 изолятов, которые по морфолого-культуральным и микроскопическим данным представляли собой палочковидные и кокковидные формы. Изоляты молочнокислых бактерий имели колонии бело-бежевого цвета, с ровными краями, выпуклой глянцевой поверхностью и характеризовались хорошим ростом на среде MRS. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Источники выделения микроорганизмов и их условное обозначение

Источник выделения	Количество выделенных изолятов	Условное обозначение
Молоко коровье	2	МК-1, МК-2

Кумыс	5	КУ-1, КУ-2, КУ-3, КУ-4, КУ-5
Кефир	2	КФ-1, КФ-2
Сметана	6	С-1, С-2, С-3, С-4, С-5, С-6
Творог	7	ТВ-1, ТВ-2, ТВ-3,ТВ-4, ТВ-5, ТВ-6, ТВ-7
Зерно пшеничное	5	Z-1, Z-2, Z-3, Z-4, Z-5

Сахаролитическая активность выделенных микроорганизмов проверялась по их способности расти на глюкозе и лактозе. Выбор данных сахаров связан с тем, что при ферментном гидролизе пивной дробины в основном образуется глюкоза, а в таком побочном продукте кисломолочной промышленности как молочная сыворотка основным сахаром является лактоза. Данные экспериментов по утилизации глюкозы и лактозы представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Способность усваивать сахара выделенными микроорганизмами

Наименование культур молочнокислых бактерий	Источник углеводов	
	глюкоза	лактоза
МК-1	+	-
МК-2	+	+
КУ-1	+	+
КУ-2	+	+
КУ-3	-	+
КУ-*4*	+	-
КУ-*5*	+	-
КФ-*1*	+	+
КФ-*2*	+	-

С-1	+	+
С-2	+	+
С-3	+	+
С-4	+	+
С-5	+	-
С-6	+	-
ТВ-1	+	-
ТВ-2	+	+
ТВ-3	+	+
ТВ-4	+	+
ТВ-5	-	+
ТВ-6	+	-
ТВ-7	+	-
Z-1	+	-
Z-2	+	-
Z-3	+	+
Z-4	+	-
Z-5	+	-

По способности сбраживать и глюкозу и лактозу было отобрано 12 штаммов: МК-2, КУ-1, КУ-2, КФ-1, С-1, С-2, С-3, С-4, ТВ-2, ТВ-3, ТВ-4, Z-3. Данные штаммы проверялись на способность закислять среду культивирования. Для этого их инкубировали на среде MRS (с глюкозой или лактозой в концентрации 40 г/л) с исходным pH=7. Замеры pH среды проводили в течение 5 суток (таблица 3 и 4).

Таблица 3 - Изменение pH среды в течение 5 суток на глюкозе

Штамм	Значение pH среды				
	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки
МК-2	6,5	6,1	5,8	5,3	5,1
КУ-1	6,1	5,9	5,4	5,0	5,0
КУ-2	6,1	5,8	5,4	4,9	4,5
КФ-1	5,8	5,3	5,0	4,7	4,6
С-1	6,4	6,0	5,7	5,3	5,0
С-2	6,4	6,1	5,7	5,4	5,1
С-3	6,3	5,7	5,3	4,9	4,5
С-4	6,4	6,0	5,7	5,4	5,1
ТВ-2	6,1	5,8	5,2	4,8	4,4
ТВ-3	5,2	4,5	4,3	4,3	4,3
ТВ-4	5,3	4,2	4,2	4,2	4,1
Z-3	6,5	6,3	5,9	5,4	5,1
Контроль	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

Таблица 4 - Изменение pH среды в течение 5 суток на лактозе

Штамм	Значение pH среды				
	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки
МК-2	6,8	6,5	6,0	5,8	5,4
КУ-1	6,3	6,0	5,8	5,5	5,1
КУ-2	6,2	5,9	5,6	5,3	5,0
КФ-1	6,1	5,8	5,3	4,9	4,6
С-1	6,6	6,2	5,9	5,5	5,2

С-2	6,7	6,3	5,9	5,6	5,4
С-3	6,5	6,1	5,8	5,3	4,9
С-4	6,6	6,2	5,9	5,7	5,3
ТВ-2	6,4	6,0	5,5	5,2	4,9
ТВ-3	5,6	4,7	4,3	4,3	4,3
ТВ-4	5,0	4,3	4,2	4,2	4,2
Z-3	6,9	6,7	6,2	5,8	5,5
Контроль	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

По способности изменять pH среды из 12 испытанных штаммов были отобраны пять штаммов - КФ-1, С-3, ТВ-2, ТВ-3, ТВ-4, которые, как видно из таблиц 3 и 4, уже на 2-3 сутки культивирования снизили pH среды до 5,0-4,2.

Активное кислотообразование бактерий рассматривается как один из важных факторов их физиологической активности. Наиболее известным биологическим свойством молочнокислых бактерий является их способность продуцировать молочную кислоту.

Данные штаммы испытывались на способность к кислотообразованию. С этой целью эти микроорганизмы выращивались на минеральной среде MRS с исходным pH=7 в течение 2-х суток для определения кислотности по Тернеру (таблица 5).

Таблица 5 – Продуцирование молочной кислоты на среде MRS с различными источниками углерода (40 г/л)

Штамм	°Т	
	На глюкозе	На лактозе
КФ-1	136,0±10,2	156,7±12,2
С-3	105,4±9,7	129,4±10,3
ТВ-2	127,5±10,3	148,5±11,2
ТВ-3	193,8±16,3	225,3±18,8

ТВ-4	176,8±14,5	212,8±16,7

При изучении кислотообразующей активности по методу Тернера молочнокислые бактерии условно подразделяют на три группы: 1 группа – с низкой кислотообразующей активностью до 40ºТ, 2 группа – со средней кислотообразующей активностью 40ºТ – 79ºТ, 3 группа – с высокой активностью от 80ºТ и выше [[xiv], [xv]]. Из пяти выбранных штаммов два штамма ТВ-3 и ТВ-4 показали высокое кислотообразование при культивирование их на на среде MRS с лактозой, что составило более 200 градусов по Тернеру.

Изучение морфолого-биохимических признаков показало, что культуры ТВ-3 и ТВ-4 грамположительные микроорганизмы и микроаэрофилы. При микроскопировании культура ТВ-3 представляет собой палочки, а ТВ-4 - одиночно и попарно расположенные кокки.

На поверхности MRS агара через 24-72 часа инкубации культуры ТВ-3 и ТВ-4 формируют круглые с ровными краями колонии, диаметром 1-3 мм, отличающиеся по цвету - ТВ-3 имеет молочный, ТВ-4- прозрачный цвет, пигментов в среду не выделяют. На MRS бульоне среда мутнеет с образованием осадка на дне.

Изучаемые культуры: каталазоотрицательные, оксидазоотрицательные, желатин не разжижают, не дезаминируют фенилаланин, не образуют сероводород, крахмал не гидролизуют, отмечается отсутствие роста на цитратном агаре Симонса, не восстанавливают нитраты, не образуют индол и аммиак, газообразных продуктов из глюкозы и лактозы не образуют. Сбраживают глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, рибозу, ксилозу и арабинозу. Растут при температуре от +15^{o}C до +40^{o}C, (температурный оптимум + 37^{o}C), при pH от 5,5 до 7,0 (оптимум pH - 6,8).

Далее отобранные нами штаммы идентифицировали методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента 16S *r*DNA гена. По результатам генетической идентификации штамм ТВ-3 отнесен к ***Lactobacillus paracasei***-95% и штамм ТВ-4 идентифицирован как ***Enterococcus durans***-99%.

Таким образом, из выделенных 27 изолятов нами были отобраны два перспективных штамма молочнокислых бактерий ТВ-3 и ТВ-4, активность которых при ферментации с лактозой на 2

сутки составила 225,3 и 212,8 градусов по Тернеру.

Список литературы

[i] Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., and Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes // Biotechnolology Advances. – 2013. – Vol. 31. – P. 877-902.

[ii] Kotzamanidis Ch., Roukas T., Skaracis G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by Lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130 // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2002. – Vol. 18. - P. 441–448.

[iii] Vijayakumar J., Aravindan R., and ViruthagiricT. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid // Cemical and Biochemical Engineering Quarterly. – 2008. – Vol. 22. – P.245-264.

[iv] Grabowska B. Biopolimers – structure, properties and applicability in the foundry industry // Archives of foundry engineering. – 2008. - Vol. 8 – P. 51 – 54.

[v] Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., and 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.

[vi] Neureiter M., Danner H., Madzingaidzo L., Miyafuji H., Thomasser C., Bvochora J., Bamusi S., and Braun R. Lignocellulose feedstocks for the production of lactic acid // Cemical and Biochemical Engineering Quarterly. – 2004. – Vol. 18. – P. 55-63.

[vii] Trontel A., Batu A., Gusi I., Slavica A. Lactic Acid Production by *Lactobacillus sp*. // Food Technol. Biotechnol. – 2011. - Vol. 49. - P. 75–82.

[viii] Герхардт Ф. Методы общей бактериологии / пер. с англ.; под ред. Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1983. – 536 с.

[ix] Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / под ред. Л.Б. Борисова. – Изд. 2-е, перераб. и доп. — М.: Медицина, 1984. — 256 с.

[x] Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. Справочник / под ред. И.П. Кондрахина. – М.: Колос, 2004. – 520 с.

[xi] Нетрусов М.А., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд-во Академия, 2005. – 608 с.

[xii] Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов / под ред. В.К. Шильниковой. – М.: Изд-во Дрофа, – 2004. – 256 с.

[xiii] Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / под ред. Г.Ф. Лакина. – Изд. 4-е, перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

[xiv] Глотова В.Н., Новиков В.Т., Яркова А.В., Иженбина Т.Н., Гордеева О.С. Концентрирование растворов молочной кислоты для получения лактида // Фундаментальные исследования. – 2013. – №8. – С. 580-584.

[xv] ГОСТ 17.4.4.02-84 Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

Түйін

Әртүрлі сүт өнімдері мен бидай тұқымдарынан 27 сүтқышқылды бактериялар бөлініп алынды. Олардан іріктелінген 12 перспективті сүтқышқылды бактериялары ішінен келесі жұмыстарға жоғары қышқылтүзуші 5 штамм: С-3, КФ-1, ТВ-2, ТВ-3 және ТВ-4 алынды. ТВ-3 мен ТВ-4 штамдары сүтқышқылын түзу продуценттік қабілеттілігін MRS лактоза қосылған қоректік ортада көрсетті, ферментация барысында оның мөлшері Тернер бойынша 200 градустан жоғары болды.

Summary

From different milk products and wheat 27 lactic acid bacteria were isolated. It was selected 12 promising strains of bacteria, strains S-3, KF-1, TV-2, TV-3 and TV-4 had high acid production ability and they were taken for further work. Strains TV-3 and TV-4 showed high level of acid production - more than 200 degrees (based on Turner) in the growth medium MRS (de Man, Rogoza and Sharpe) with a lactose.