

УДК 576. 8. 095

Саламатзадех А.А.

*Бакинский государственный университет, Лахиджанский исламский
свободный университет*

Ганбаров Х.Г

Бакинский государственный университет

Кафшдарджалал А.М.

Лахиджанский исламский свободный университет

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУЦИРОВАНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ У БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS**

A. Salamatzadeh

Baku State University, Lahijan Islam Free University, Iran

Kh. Ganbarov

Baku State University

A. KafshadarjalaliLahijan

Islam Free University, Iran

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON LACTIC ACID PRODUCTION BY BACTERIA GENUS *LACTOBACILLUS*

Аннотация. Отобрана культура молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* 1058 в качестве продуцента молочной кислоты и изучено влияние некоторых физиологических факторов (источники углерода и азота, исходная кислотность и встряхивания) на продуцирование молочной кислоты. Подобраны оптимальные условия культивирования продуцента для максимального выхода молочной кислоты: источник углерода-глюкоза-100 г/л; источник азота-кукурузная мука-16г/л; исходная кислотность среды –рН5,5; скорость встряхивания жидкой культуры-200об/мин.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, продуценты, источники углерода и азота, исходная кислотность среды, выход молочной кислоты, продуктивность культуры.

Abstract. A *Lactobacillus plantarum* 1058 strain was selected as a producer of lactic acid and the influence of carbon and nitrogen on lactic acid production was studied. It has been established that maximum amount of lactic acid production takes place in medium: glucose – 100g/l as a carbon source, corn steep – 16g/l, as a nitrogen source, pH 5,5, shaking 200 rot./min.

Key words: lactic acid bacteria, producer, carbon and nitrogen sources, acidity of medium, yield of lactic acid, productivity.

Молочная кислота является широко применяемым в практической деятельности человека веществом. Она находит применение в пищевой промышленности и фармакологии. Особый интерес представляет использование молочной кислоты как сырья для получения полимера полилактита. Последний широко употребляется в производстве биоразлагаемых пластических посуды, одноразовых гигиенических средств и упаковок [6; 8].

Молочную кислоту способны синтезировать как бактерии, так и грибы. Молочнокислые бактерии в процессе молочнокислого брожения синтезируют молочную кислоту в большом количестве. В промышленном масштабе молочную кислоту получают с помощью молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* [4; 9].

* © Саламатзадех А.А., Ганбаров Х.Г., Кафшдарджалал А.М.

Количество продуцируемой молочной кислоты у бактерий в значительной степени зависит от условий ферментации и ингредиентов питательной среды [3; 5]. Изучение влияния этих факторов на процесс ферментации позволит оптимизировать образование и накопление молочной кислоты в среде.

Настоящая работа посвящена изучению влияния факторов питательной среды на продуцирование молочной кислоты у бактерий рода *Lactobacillus*.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*: *L. bulgaricus* 1332, *L. casei* 1607; *L. delbrueckii* 1333; *L. plantarum* 1058, полученные из коллекции культур Иранской Исламской Республики.

Бактерии выращивались на среде следующего состава (г/л): источник углерода – 40; дрожжевой экстракт - 10; Na - уксуснокислый. $3\text{H}_2\text{O}$ – 1; K_2HPO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; Mn SO_4 - 0,03; дистиллированная вода – 1л, pH – 6,0 – 6,5 [7].

Инкубацию культур осуществляли в жидкой среде при температуре 35°C в течение 48

часов на качалке с 200 об/мин.

Количество молочной кислоты определяли титрометрическим методом [1]. В супернатант культуры (25 мл) добавляли 3 капли фенолфталеина в качестве индикатора. Затем в раствор с помощью бюретки медленно (по каплям) добавляли 0,1М NaOH до появления разовой окраски. Учитывая, что 1мл 0,1М NaOH соответствует 90,08 мг молочной кислоты, рассчитывали количество молочной кислоты в г/л.

В качестве источников углерода использовали глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, ксилозу и арабинозу.

В качестве неорганических источников азота использовали NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, а в качестве органического источника азота потребляли пентон, мочевины, аспарагин, кукурузную муку и дрожжевой автолизат. Источники азота добавляли в среду 0,05% (в пересчете по азоту), а пентан, кукурузную муку и дрожжевой автолизат – 5г/л.

Все эксперименты проводились в 4-х повторностях и обрабатывались статистически [2].

Таблица 1

Образование молочной кислоты бактериями рода *Lactobacillus*

Бактерии	Количество молочной кислоты	
	выход, г/л	Продуктивность, г/л/час
<i>L. bulgaricus</i> 1332	24 ± 1,8	0,50
<i>L. plantarum</i> 1058	29 ± 2,1	0,60
<i>L. delbrueckii</i> 1333	15 ± 1,1	0,31
<i>L. casei subsp. casei</i> 1607	19 ± 1,1	0,40

Таблица 2

Влияние источников углерода на выход молочной кислоты у молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*

Бактерии	Источники углерода					
	глюкоза	сахароза	лактоза	мальтоза	ксилоза	арабиноза
<i>L. plantarum</i> 1058	24,9±2,1	17,4±0,9	14,6±0,8	11,1±0,7	8,8±0,3	10,7±0,4
<i>L. bulgaricus</i> 1332	21,8±0,7	18,4±0,7	16,6±1,0	12,4±0,7	7,0±0,2	9,4 ± 0,2

Результаты и их обсуждение

Проведено сравнительное изучение образования молочной кислоты у четырех штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* (таб. 1). Показано, что наибольшее накопление молочной кислоты происходит у бактерий *Lactobacillus plantarum* 1058, а наименьшее – у *L.delbrueckii* 1333. Так, выход молочной кислоты и продуктивность у *L. plantarum* 1058 была в 1,2; 1,9 и 1,5 раза больше, чем, соответственно у *L. bulgaricus* 1332, *L.delbrueckii* 1333 и *L.casei subsp. casei* 1607.

У культур *Lactobacillus plantarum* 1058 и *L. bulgaricus* 1332, проявляющих высокую продуктивность изучено влияние простых сахаров (в качестве источников углерода) на выход молочной кислоты (табл. 2).

Наибольшее количество молочной кислоты у обеих культур обнаружено на среде с глюкозой, а наименьшее – с ксилозой. У *Lactobacillus plantarum* 1058 выход молочной кислоты на среде с глюкозой в 1,4; 1,7; 2,2; 2,8; и 2,3 раза больше чем, соответственно, на средах с сахарозой, лактозой, мальтозой, ксилозой и арабинозой. Количество молочной кислоты на среде с глюкозой у *L. plantarum* 1058 в 1,14 раза больше, по сравнению с культурой *L. bulgaricus* 1332.

У культуры *L. plantarum* 1058, продуцирующей наибольшее количество молочной кислоты, изучено влияние концентрации глюко-

зы на выход кислоты (табл. 3). Показано, что по мере увеличения концентрации глюкозы от 40 до 100г/л происходит увеличение выхода молочной кислоты. Так, выход молочной кислоты и продуктивность культур при концентрации глюкозы 100г/л была в 2,1; 1,7 и 1,4 раза больше чем, соответственно, при концентрации 40, 60 и 80 г/л.

Выход молочной кислоты и продуктивность культуры при концентрации глюкозы 100 г/л была в 1,10 и 1,14 раза больше чем, соответственно, при концентрациях 120 и 140 г/л. Следовательно, увеличение концентрации глюкозы выше 100г/л приводит к постепенному понижению выхода молочной кислоты и продуктивности культуры (табл. 3).

Изучение влияния источников азота на продуцирование молочной кислоты у *L. plantarum* 1058 показало, что из неорганических источников азота аммонийные соли усваиваются лучше, чем нитратные. Так, выход молочной кислоты и продуктивность культуры в присутствии аммонийных солей было 1,3 – 2,5 раза больше, чем в присутствии солей нитрата (табл. 4). Наибольшее накопление молочной кислоты обнаружено в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и NH_4Cl , так как выход молочной кислоты и продуктивность культуры были в 1,3 – 1,7 раза больше по сравнению с NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Таблица 3

Влияние концентрации глюкозы на выход молочной кислоты у *Lactobacillus plantarum* 1058

Концентрация глюкозы, г/л	Количество молочной кислоты	
	выход, г/л	продуктивность, г/л/час
40	23,4 ± 1,8	0,49
60	28,8 ± 1,4	0,60
80	36,4 ± 2,1	0,76
100	48,6 ± 2,2	1,01
120	46,4 ± 2,0	0,97
140	42,6 ± 1,7	0,89

Все использованные органические источники азота лучше потреблялись культурой, что и увеличивало выход молочной кислоты. Наибольшее накопление молочной кислоты наблюдалось в присутствии дрожжевого экстракта и кукурузной муки. Так, выход молочной кислоты и продуктивность культуры при использовании последних были в 1,2 – 1,5 раза больше по сравнению с пентаном, мочевиной и аспарагином (табл. 4).

Изучение влияния концентрации кукурузной муки на образование молочной кислоты показало, что наибольший выход молочной кислоты и продуктивности культуры наблюдается при концентрации 16 г/л.

Данные по влиянию исходной кислотности среды на образование молочной кислоты у *Lactobacillus plantarum* 1058 представлены в табл. 5. Показано, что наибольшее накопление молочной кислоты происходило при

Таблица 4

Влияние источников азота на выход молочной кислоты у бактерий *Lactobacillus plantarum* 1058

Источники азота	Количество молочной кислоты	
	выход, г/л	продуктивность, г/л/час
NaNO ₃	18,8 ± 0,9	0,39
NH ₄ NO ₃	31,7 ± 2,2	0,66
(NH ₄) ₂ SO ₄	41,8 ± 3,4	0,87
NH ₄ Cl	40,4 ± 2,6	0,84
(NH ₄) ₂ CO ₃	28,6 ± 1,1	0,60
NH ₄ H ₂ PO ₄	24,8 ± 2,1	0,52
NH ₄ H ₂ PO ₄	24,2 ± 2,2	0,50
KNO ₃	16,8 ± 1,2	0,85
мочевина	32,8 ± 2,3	0,68
аспарагин	37,9 ± 2,4	0,79
пентан	38,6 ± 2,4	0,80
кукурузная мука	44,4 ± 2,8	0,93
дрожжевой экстракт	48,1 ± 2,8	1,0

Таблица 5

Влияние исходной кислотности среды на выход молочной кислоты у бактерий *Lactobacillus plantarum* 1058

Исходная кислотность среды, pH	Количество молочной кислоты	
	выход, г/л	продуктивность, г/л/час
3,0	20,4 ± 0,8	0,43
3,5	29,0 ± 2,0	0,60
4,0	41,1 ± 2,4	0,86
4,5	50,1 ± 1,3	1,04
5,0	57,3 ± 3,0	1,19
5,5	58,2 ± 3,1	1,21
6,0	54,0 ± 2,4	1,13
6,5	50,6 ± 3,1	1,05
7,0	38,7 ± 2,1	0,81
7,5	27,8 ± 0,9	0,58

исходной кислотности рН 5,5. Уменьшение кислотности среды от рН 3 до 5,5 приводило к увеличению выхода молочной кислоты и продуктивности культуры в 2,9 раза. Дальнейшее уменьшение исходной кислотности среды приводило к понижению количества молочной кислоты. Так, при изменении исходной кислотности от рН 5,5 до рН 7,0 выход кислоты и продуктивность культуры уменьшились в 1,5 раза.

Скорость встряхивания жидкой культуры тоже влияла на процесс образования молочной кислоты. Увеличение скорости встряхивания от 100 до 200 об/мин приводило к увеличению выхода молочной кислоты и продуктивности культуры в 1,35 раза (табл. 6)). При встряхивании 250 об./мин выход молочной кислоты и продуктивность культуры уменьшились в 1,2 раза.

Таким образом, отображена культура мо-

Таблица 6

Влияние скорости встряхивания жидкой среды на выход молочной кислоты у бактерий *Lactobacillus plantarum* 1058

Скорости встряхивания, оборот/мин.	Количество молочной кислоты	
	выход, г/л	продуктивность, г/л/час
100	43,7 ± 1,6	0,91
150	54,2 ± 2,7	1,13
200	58,8 ± 3,2	1,23
250	50,9 ± 2,8	1,06

лочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* 1058 в качестве продуцента молочной кислоты и подобраны оптимальные условия культивирования для максимального выхода кислоты: источник углерода – глюкоза-100г/л, источник азота – кукурузная мука-16г/л, исходная кислотность среды – рН 5,5, скорость встряхивания жидкой культуры – 200 об/мин.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1972. 455 с.
2. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: МГУ, 1979. 150 с.
3. Саламатзаде А.А. Влияние CaCO₃ и NaOH на образование молочной кислоты у бактерий рода *Lactobacillus* //Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана. Баку:Элм, 2010. Т.8. С. 83-87.
4. Akerberg Ch., Zacchi G. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour //Bioresearch Technology. 200, V.75. № 2. P. 119-126.
5. Cock L., Stonvene A. Lactic acid production by a strain of *Lactobacillus lactis subs. Lactic* isolated from sugar cane plants // Electronic. Jour. Biotechnology, 2006. V.9. № 1. P. 40-45.
6. Data R., Henry M. Lactic acid: resent advances in products presses and technologies // Jour. Chem. Technol, Biotechnol. 2006. V.81. P.1119-1129.
7. De Man J., Rogosa M., Sharpe M. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* // Jour. Appl. Bacteriol. 1960. V.23. P.130-135.
8. Narayanan N., Roychondhury P., Srivastava A. Lactic acid fermentation and its product polymerization // Europ. Jour/ Biotechnol. 2004. V. 7. P. 167-179.
9. Schepers A., Thibault J., Lactorik C. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH- controlled batch cultures in whey permeate yeast extract medium // Enzgme Microbiol. Technol. 2002. V.30. P. 187-194.