

Научная статья/Research Article

УДК 579.66

DOI: 10.36718/1819-4036-2024-10-200-206

Наталья Юрьевна Шарова¹, Оксана Витальевна Астафьева²,
Владислав Эдуардович Путилов^{3✉}, Анатолий Павлович Непомнящий⁴,
Руслан Евгеньевич Моисеев⁵

^{1,2,3,4,5}Всероссийский НИИ пищевых добавок – филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова
РАН, Санкт-Петербург, Россия

¹natalya_sharova1@mail.ru

²astra39@list.ru

³vladislav.e.putilov@gmail.com

⁴непомняший.95@mail.ru

⁵rus.moiseev2003@mail.ru

ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ОБРАБОТКИ МЕЛАССЫ НА СИНТЕЗ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ БАКТЕРИЯМИ РОДА *ENTEROCOCCUS*

Цель исследования – определение параметров для экономически эффективного производства молочной кислоты из вторичного сырья (свекловичной мелассы) с использованием молочно-кислых бактерий видов *Enterococcus faecium* и *Enterococcus sp.*; оценка целесообразности применения актуальных методов предварительной обработки мелассы (с помощью ЭДТА, Трилона Б, ЖКС). В результате проведенных исследований изучена способность штаммов бактерий рода *Enterococcus* к биосинтезу молочной кислоты (МК) с использованием питательных сред с различным содержанием свекловичной мелассы в качестве источника углерода. Меласса является побочным продуктом сахарной промышленности. Бактерии видов *Enterococcus faecium* и *Enterococcus sp.* были изолированы из ферментированных пшеничных отрубей. Культивирование на предварительно обработанной мелассе проводилось 72 ч, культивирование на средах с разной концентрацией источника углерода – 48 ч. Процесс ферментации проводился в качалочных колбах. Определение содержания МК осуществлялось с помощью капиллярного электрофореза. При ферментации предварительно обработанной мелассы наибольшая концентрация МК в культуральной жидкости достигла 16,8 г/л (*E. faecium*, 48 ч с начала культивирования, обработка трилоном Б). Концентрация МК в опытах с использованием необработанной мелассы достигла 16,2 г/л (*E. faecium*) и 16,4 г/л (*E. sp.*). При культивировании исследуемых штаммов на необработанной мелассе наибольший выход МК получен при массовой концентрации сахаров в среде 75 г/л. Значение показателя находилось практически на одном уровне и составило 14,20 г/л для *E. faecium* и 14,21 г/л для *E. sp.*, а степень биоконверсии – 18,93 и 18,95 % соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что культивирование бактерий *E. faecium* и *E. sp.* на необработанной свекловичной мелассе может быть использовано как экономически эффективный способ получения МК и утилизации вторичного сырья.

Ключевые слова: молочная кислота, *Enterococcus faecium*, изолированная культура, меласса, капиллярный электрофорез, культивирование

Для цитирования: Влияние методов обработки мелассы на синтез молочной кислоты бактериями рода *Enterococcus* / Н.Ю. Шарова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 10. С. 200–206. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-10-200-206.

Natalia Yuryevna Sharova¹, Oksana Vitalievna Astafieva², Vladislav Eduardovich Putilov³✉,
Anatoly Pavlovich Nepomnyashchy⁴, Ruslan Evgenievich Moiseev⁵,

1,2,3,4,5All-Russian Research Institute of Food Additives – branch of the V.M. Gorbатов Federal Scientific Center of Food Systems of the RAS, St. Petersburg, Russia

¹natalya_sharova1@mail.ru

²astra39@list.ru

³vladislav.e.putilov@gmail.com

⁴nepomnyashiy.95@mail.ru

⁵rus.moiseev2003@mail.ru

MOLASSES PROCESSING METHODS EFFECT ON LACTIC ACID SYNTHESIS BY ENTEROCOCCUS BACTERIA

*The aim of the study was to determine the parameters for cost-effective production of lactic acid from secondary raw materials (beet molasses) using lactic acid bacteria of the species *Enterococcus faecium* and *Enterococcus sp.*; to assess the feasibility of using current methods of molasses pre-treatment (using EDTA, Trilon B, JCS). As a result of the studies, the ability of *Enterococcus* bacterial strains to biosynthesize lactic acid (LA) was studied using nutrient media with different contents of beet molasses as a carbon source. Molasses is a by-product of the sugar industry. Bacteria of the species *Enterococcus faecium* and *Enterococcus sp.* were isolated from fermented wheat bran. Cultivation on pre-treated molasses was carried out for 72 h, fermentation on media with different concentrations of the carbon source – 48 h. The fermentation process was carried out in shaking flasks. The content of LA was determined using capillary electrophoresis. During fermentation of pre-treated molasses, the highest MC concentration in the culture fluid reached 16.8 g/l (*E. faecium*, 48 h from the start of fermentation, treatment with Trilon B). The MC concentration in experiments using untreated molasses reached 16.2 (*E. faecium*) and 16.4 g/l (*E. sp.*). When culturing the studied strains on untreated molasses, the highest MC yield was obtained at a mass concentration of sugars in the medium of 75 g/l. The value of the indicator was practically at the same level and amounted to 14.20 g/l for *E. faecium* and 14.21 g/l for *E. sp.*, and the degree of bioconversion was 18.93 and 18.95 %, respectively. The data obtained indicate that the fermentation of *E. faecium* and *E. sp.* Bacteria on untreated sugar beet molasses can be used as a cost-effective method for obtaining lactic acid and recycling secondary raw materials.*

Keywords: lactic acid, *Enterococcus faecium*, isolated culture, molasses, capillary electrophoresis, fermentation

For citation: Molasses processing methods effect on lactic acid synthesis by *Enterococcus* bacteria / N.Yu. Sharova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(10): 200–206 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-10-200-206.

Введение. Молочная кислота (МК) – предельная органическая кислота, широко востребованная в промышленности. МК широко применяется в различных технологиях. Благодаря своим свойствам МК представляет собой полезный продукт, который используется в качестве сырья для получения различных соединений (акриловых полимеров, пропиленгликоля). В косметической индустрии МК используется при производстве гигиенических и эстетических продуктов благодаря ее увлажняющему, антимикробному и омолаживающему воздействию

на кожу, а также в составе средств для ухода за полостью рта. Примерно 70 % производимой МК используется в пищевой промышленности [1].

Существуют два основных метода синтеза МК: химический и биотехнологический. Химический метод получения МК менее предпочтителен в связи с тем, что в результате химического синтеза всегда образуется рацемическая смесь [2]. Микробиологический синтез относительно быстрый, обладает высокой продуктивностью и может селективно привести к образованию одного из двух стереоизомеров МК или

их рацемической смеси в зависимости от используемого микроорганизма [3].

Молочнокислые бактерии получили свое название благодаря их способности синтезировать МК в качестве основного (а иногда единственного) продукта брожения. Многие молочнокислые бактерии также кодируют ферменты, необходимые для аэробного дыхания, но ни одна из них не синтезирует гем. Таким образом, дыхательная цепь нефункциональна, если не добавлять гем в питательную среду [1]. Одними из наиболее распространенных продуцентов МК являются бактерии рода *Lactobacillus*. Однако ведутся исследования по поиску новых продуцентов МК. Перспективными микроорганизмами в этой сфере исследований являются бактерии родов *Streptococcus* или *Enterococcus* [4, 5].

В биотехнологическом производстве МК широко применяется вторичное сырье, в частности меласса. Свекловичная и тростниковая мелассы известны как побочный продукт в производстве сахара и широко используются в кормлении животных. Массовая доля сахарозы в свекловичной мелассе составляет от 46,5 до 66,1 %. Глюкоза и фруктоза содержатся на уровне 0,3 % в пересчете на сухое вещество [6].

Однако использование мелассы в качестве субстрата для получения МК биотехнологическим путем иногда демонстрирует ингибирование роста продуцентов и пониженный выход целевого продукта. Это можно объяснить наличием ионов металлов или ингибирующих соединений, замедляющих рост микроорганизмов. Таким образом, предварительные этапы обработки мелассы считаются необходимыми для увеличения выхода целевого продукта при получении МК биотехнологическим способом [7].

Цель исследования – определение параметров для экономически эффективного производства МК из вторичного сырья (свекловичной мелассы) с использованием молочнокислых бактерий видов *Enterococcus faecium* и *Enterococcus* sp.; оценка целесообразности применения актуальных методов предварительной обработки мелассы с помощью ЭДТА, Трилона Б, ЖКС. Достигнутые концентрации МК были сравнены с концентрациями МК, полученными при

культивировании бактерий на средах, где в качестве источника углерода использовались глюкоза и необработанная меласса.

Объекты и методы. Объектом исследования являются два штамма молочнокислых бактерий – *Enterococcus faecium* и *Enterococcus* sp. Изоляты получены из пшеничных отрубей, предоставленных АО «Петербургский мельничный комбинат» (Санкт-Петербург, Российская Федерация). Для идентификации использовалось секвенирование 16S рПНК во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии. Матрицы для секвенирования были синтезированы с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) при использовании универсальных праймеров для амплификации гена 16S рПНК [8].

Для повышения продуктивности штаммов в отношении синтеза молочной кислоты при ферментации свекловичной мелассы проведены несколько опытов по предварительной обработке вторичного сырья с целью минимизации уровня органических и неорганических ингибиторов роста микроорганизмов в мелассе. В этом эксперименте мелассу обрабатывали тремя разными реагентами в количестве 4 мг/л: гексацианоферратом (II) калия (желтая кровяная соль, ЖКС) (1), динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (Трилон Б) (2), этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (3). Концентрации ЖКС, Трилона Б и ЭДТА были рассчитаны по отношению к массе мелассы, добавленной в питательную среду [7].

В данном эксперименте использовалась свекловичная меласса, произведенная на Скидельском сахарном комбинате (Беларусь). Меласса содержит $(49,5 \pm 2,0)$ % (массовая доля) общих сахаров, в основном представленных сахарозой, а также низкими концентрациями глюкозы, фруктозы и рафинозы. В таблице 1 представлены значения массовых долей сахарозы, глюкозы и фруктозы в использованной мелассе, полученные с помощью капиллярного электрофореза («Капель-105М», Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге и Ленинградской области).

Содержание основных сахаров в мелассе

Вид сахара	Массовая доля, %	Погрешность (неопределенность), %
Сахароза	49,50	3,70
Глюкоза	Менее 0,20	–
Фруктоза	0,19	0,02

Для эффективной обработки мелассы, способствующей продуктивному синтезу МК, была использована питательная среда с идентичными минеральным составом и содержанием источника азота. Питательная среда содержала равное количество минеральных солей и дрожжевого экстракта, г/л: NaCl – 6,0; Na₂CO₃ – 6,0; дрожжевой экстракт – 10. Варьировались лишь источники углерода: глюкоза, необработанная меласса и меласса, обработанная одним из реагентов – ЖКС, Трилоном Б, ЭДТА. В каждой питательной среде суммарно содержалось 20 г/л сахаров.

Для изучения зависимости концентрации синтезируемой продуцентами МК и выхода продукта от концентрации сахара в питательной среде были использованы питательные среды с тем же составом, за исключением источника углерода; в качестве источника углерода была использована необработанная меласса в различных концентрациях (в пересчете на общие сахара, г/л): 5, 10, 25, 50, 75, 100.

Питательная среда для инокулята была приготовлена, г/л: глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 10; NaCl – 6,0; Na₂CO₃ – 6,0. Культивирование инокулята проводилось в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, рабочим объемом 100 мл, при 37 °С, без перемешивания в течение суток. Перед внесением инокулята в колбы его оптическая плотность D₆₀₀ составляла 1,0. Инокулят внесен в количестве 10 % от объема питательной среды.

Основные этапы культивирования также были проведены в колбах Эрленмейера с рабочим объемом 100 мл. Культивирование проходило при 37 °С без перемешивания.

В эксперименте по установлению эффективной обработки мелассы культивирование продолжалось трое суток. Для сравнения показателей продуктивности культур на средах с различной концентрацией мелассы в питательной среде культивирование продолжалось двое суток.

Концентрация молочной кислоты была определена с использованием методики М 04-47-

2012 [9], которая заключается в разведении образцов дистиллированной водой, последующем их разделении и точном определении содержания кислоты методом капиллярного электрофореза. Для обнаружения компонентов использовалась длина волны 254 нм [10].

Для определения концентрации молочной кислоты в растворе использовалась система капиллярного электрофореза «Капель-205М» с отрицательной полярностью высокого напряжения. Внутренний диаметр капилляра 75 мкм, полная длина капилляра 60 см.

Перед внесением проб проводилось осаждение белка добавлением метанола и центрифугированием в течение 15 мин при 12 000 оборотах. Далее супернатант разводили дистиллированной водой. Итоговая кратность разбавления культуральной жидкости составила 400 раз.

Результаты и их обсуждение. Для изучения влияния методов обработки мелассы на биосинтез МК культуры *E. faecium* и *E. sp* выращивали в колбах Эрленмейера при 37 °С в течение трех суток с использованием глюкозы и мелассы, предварительно обработанной различными реагентами в количестве, эквивалентном концентрации общих сахаров, 20 г/л. Через каждые 24 ч культивирования отбирали пробы культуральной жидкости (КЖ). Как показано в таблице 2, максимальная концентрация МК достигалась на вторые или третьи сутки процесса. Снижение концентрации МК на третьи сутки может быть связано с тем, что бактерии начали использовать выделенную МК в качестве источника углерода. В случае *E. faecium* наибольшее количество МК содержалось в КЖ, полученной при ферментации мелассы, обработанной Трилоном Б, – 16,8 г/л. В случае *E. sp*. наибольшее количество МК содержалось в КЖ, полученной при ферментации необработанной мелассы в течение трех суток. Следует отметить низкие концентрации молочной кислоты в КЖ при использовании глюкозы в качестве источника углерода. Предположительно, это объясняется содержанием различных факторов роста в мелассе.

Кроме того, меласса имеет богатый минеральный состав, ионы которого могут повышать буферную емкость питательной среды, однако в

случае с использованием глюкозы в качестве источника углерода такого не наблюдается.

Таблица 2

Содержание молочной кислоты в культуральной жидкости в зависимости от обработки мелассы различными реагентами

Изолят	Источник углерода	Массовая концентрация МК на этапе культивирования, г/л		
		24 ч	48 ч	72 ч
<i>E. faecium</i>	Глюкоза	5,8±1,2	6,9±1,4	6,7±1,4
	Меласса, обработанная ЖКС	13,8±2,8	15,2±3,0	16,2±3,2
	Меласса, обработанная ЭДТА	11,8±2,4	14,2±2,9	13,8±2,8
	Меласса, обработанная Трилоном Б	15,5±3,1	16,8±3,4	15,4±3,1
	Необработанная меласса	12,8±2,6	16,0±3,2	16,1±3,2
<i>E. sp.</i>	Глюкоза	6,6±1,3	6,4±1,3	7,1±1,4
	Меласса, обработанная ЖКС	14,7±2,9	15,5±3,1	16,0±3,2
	Меласса, обработанная ЭДТА	13,2±2,6	14,4±2,9	16,1±3,2
	Меласса, обработанная Трилоном Б	11,7±2,3	15,9±3,2	15,4±3,1
	Необработанная меласса	15,6±3,1	15,7±3,1	16,4±3,3

Для изучения влияния концентрации мелассы на синтез молочной кислоты культуры *E. faecium* и *E. sp.* выращивали в колбах Эрленмейера при 37 °С в течение двух суток с использованием необработанной мелассы в качестве источника углерода. Количество мелассы в каждой питательной среде в пересчете на общие сахара составило, г/л: 5; 10; 25; 50; 75; 100. Как показано в таблице 3, степень биоконверсии снижается с увеличением концентрации мелассы, содержащейся в питательной среде. Высокая степень биоконверсии в случае *E. sp.* при использовании мелассы в массовой концентрации 10 г/л (5 г/л общих сахаров) степень биоконверсии достигает 141,4 %. Предположитель-

но, это объясняется использованием в качестве источника углерода дрожжевого экстракта и органических кислот и других органических соединений, содержащихся в мелассе. Культивирование микроорганизмов на питательных средах, содержащих различные концентрации необработанной мелассы, показало снижение степени биоконверсии при увеличении концентрации источника углерода. Повышенное содержание сахаров оказывает ингибирующее действие на рост бактериальной культуры и биохимические процессы, связанные с биосинтезом МК. Одной из возможных причин этого явления может быть осмотический стресс, который приводит к замедлению метаболизма бактерий [8].

Таблица 3

Показатели ферментации сред на основе необработанной мелассы

Изолят	Массовая концентрация общих сахаров, г/л	Массовая концентрация МК, г/л	Биоконверсия, к количеству сахаров в питательной среде, %
1	2	3	4
<i>E. sp.</i>	5	7,07±1,41	141,40
	10	6,80±1,36	68,00
	25	8,08±1,62	32,32
	50	11,76±2,35	23,52
	75	14,21±2,84	18,95
	100	13,68±2,74	13,68

1	2	3	4
<i>E. faecium</i>	5	4,85±0,97	97,00
	10	7,62±1,52	76,20
	25	8,25±1,65	33,00
	50	12,00±2,40	24,00
	75	14,20±2,84	18,93
	100	15,50±3,10	15,50

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования необработанной мелассы в качестве экономически конкурентного сырья для биосинтеза МК. Несмотря на то что концентрация МК в культуральной жидкости, полученной при ферментации необработанной мелассы в качестве источника углерода, не максимальна (16,2 г/л для *E. faecium*, 15,7 г/л для *E. sp.*), использование дорогих реагентов для обработки сырья и усложнение технологического процесса не всегда эффективно влияют на производственный процесс.

Список источников

1. Lactic acid properties, applications and production: A review / F.A.C. Martinez [et al.] // Trends in food science & technology. 2013. V. 30, № 1. P. 70–83.
2. Dey P., Pal P. Direct production of l (+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions // Journal of membrane science. 2012. V. 389. P. 355–362.
3. Lactic acid bacteria: classification and physiology / L. Axelsson [et al.] // Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker. 2004. V. 139. P. 1–66.
4. Subramanian M.R., Talluri S., Christopher L.P. Production of lactic acid using a new homofermentative *Enterococcus faecalis* isolate // Microbial biotechnology. 2015. V. 8, № 2. P. 221–229.
5. Streptococcus thermophilus strains: Multifunctional lactic acid bacteria / R. Iyer [et al.] // International Dairy Journal. 2010. V. 20, № 3. P. 133–141.
6. Characterization of molasses chemical composition / A. Palmonari [et al.] // Journal of

- dairy science. 2020. V. 103, № 7. P. 6244–6249.
7. Sequential optimization of the fermentation factors with integrating seed culture adaptation for increased biorefinery of beet molasses to lactic acid / H.M.A. Alrefaey [et al.] // Biomass Conversion and Biorefinery. 2021. V. 11. V. 1013–1028.
8. Влияние различных концентраций глюкозы на синтез молочной кислоты бактериями рода *Enterococcus* / А.П. Непомнящий [и др.] // Научный журнал НИУ ИТМО. Сер. «Процессы и аппараты пищевых производств». 2023. № 3 (57). С. 40–50.
9. М 04-47-2012. Определение органических кислот в винодельческой, соковой, алкогольной, безалкогольной, слабоалкогольной и пивоваренной продукции при использовании системы капиллярного электрофореза «Капель-105М» (Россия). М., 2012.
10. Capillary electrophoresis method validation for organic acids assessment in probiotics / F. Gatea [et al.] // Food Analytical Methods. 2015. V. 8. P. 1335–1340.

References

1. Lactic acid properties, applications and production: A review / F.A.C. Martinez [et al.] // Trends in food science & technology. 2013. V. 30, № 1. P. 70–83.
2. Dey P., Pal P. Direct production of l (+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions // Journal of membrane science. 2012. V. 389. P. 355–362.
3. Lactic acid bacteria: classification and physiology / L. Axelsson [et al.] // Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker. 2004. V. 139. P. 1–66.

4. *Subramanian M.R., Talluri S., Christopher L.P.* Production of lactic acid using a new homofermentative *Enterococcus faecalis* isolate // *Microbial biotechnology*. 2015. V. 8, № 2. P. 221–229.
5. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria / *R. Iyer* [et al.] // *International Dairy Journal*. 2010. V. 20, № 3. P. 133–141.
6. Characterization of molasses chemical composition / *A. Palmonari* [et al.] // *Journal of dairy science*. 2020. V. 103, № 7. P. 6244–6249.
7. Sequential optimization of the fermentation factors with integrating seed culture adaptation for increased biorefinery of beet molasses to lactic acid / *H.M.A. Alrefaey* [et al.] // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021. V. 11. V. 1013–1028.
8. Vliyanie razlichnykh koncentracij glyukozy na sintez molochnoj kisloty bakteriyami roda *Enterococcus* / *A.P. Nepomnyashchij* [i dr.] // *Nauchnyj zhurnal NIU ITMO. Ser. «Processy i apparaty pischevyh proizvodstv»*. 2023. № 3 (57). С. 40-50.
9. М 04-47-2012. Opredelenie organicheskikh kislot v vinodel'cheskoj, sokovoj, alkogol'noj, bezalkogol'noj, slaboalkogol'noj i pivovarennoj produkcii pri ispol'zovanii sistemy kapillyarnogo `elektroforeza «Kapel'-105M» (Rossiya). М., 2012.
10. Capillary electrophoresis method validation for organic acids assessment in probiotics / *F. Gatea* [et al.] // *Food Analytical Methods*. 2015. V. 8. P. 1335–1340.

Статья принята к публикации 10.04.2024 / The article accepted for publication 10.04.2024.

Информация об авторах:

Наталья Юрьевна Шарова¹, заместитель директора по научной работе, доктор технических наук, профессор РАН

Оксана Витальевна Астафьева², научный сотрудник, кандидат биологических наук

Владислав Эдуардович Путилов³, лаборант-исследователь

Анатолий Павлович Непомнящий⁴, аспирант, младший научный сотрудник

Руслан Евгеньевич Моисеев⁵, лаборант-исследователь

Information about the authors:

Natalia Yuryevna Sharova¹, Deputy Director for Research, Doctor of Technical Sciences, Professor at the RAS

Oksana Vitalievna Astafieva², Researcher, Candidate of Biological Sciences

Vladislav Eduardovich Putilov³, Laboratory Research Assistant

Anatoly Pavlovich Nepomnyashchy⁴, Postgraduate student, Junior Researcher

Ruslan Evgenievich Moiseev⁵, Laboratory Research Assistant

