

*И.А. Сидерко, Н.К. Жабанос, к.т.н., Е.Н. Бирюк, к.с.-х.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## ОЦЕНКА УРОВНЯ БИОСИНТЕЗА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ШТАММАМИ ГЕТЕРОФЕРМЕНТАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ

*I. Siderko, N. Zhabanos, A. Biruk, N. Furik  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

## ASSESSMENT OF THE LEVEL OF BIOSYNTHESIS OF LOW MOLECULAR WEIGHT ORGANIC ACIDS BY HETEROFERMENTATIVE BACTERIAL STRAINS

*e-mail: myirinka718@gmail.com, nzhabanos@tut.by, biohimbel@rambler.ru, furik\_nn@tut.by*

Для эффективного консервирования растительного и зернового сельскохозяйственного сырья возможно использование органических кислот, которые предпочтительно получать биологическими методами. При культивировании гетероферментативных бактерий синтезируется ряд органических кислот в зависимости от видовой принадлежности, свойств штамма и условий биосинтеза. В статье приведены данные о содержании молочной, уксусной, масляной кислот в культуральных жидкостях штаммов гетероферментативных молочнокислых и пропионовокислых бактерий, свидетельствующие о возможности применения продуктов биосинтеза для использования их в качестве консервирующих агентов.

**Ключевые слова:** гетероферментативные бактерии, молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии, промышленный биосинтез органических кислот.

*For effective preservation of plant and grain agricultural raw materials it is possible to use organic acids, which are preferably obtained by biological methods. When cultivating heterofermentative bacteria, a number of organic acids are synthesized depending on the species, strain properties and biosynthesis conditions. The article presents data on the content of lactic, acetic, and butyric acids in the culture fluids of strains of heterofermentative lactic acid and propionic acid bacteria, indicating the possibility of using the products of biosynthesis to use them as preserving agents.*

**Key words:** heterofermentative bacteria, lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, industrial biosynthesis of acidic acid.

**Введение.** На различных стадиях технологического процесса заготовки и хранения растительных масс и зерновых культур происходит конкурентное взаимодействие бактерий эпифитной микрофлоры. Развитие и доминирование нежелательной микрофлоры приводит к негативным процессам в сырье, которые ухудшают его питательную ценность и снижают стабильность. Сохранение качества и безопасности сельскохозяйственного сырья и кормовых продуктов является актуальной задачей.

Представителями нежелательной эпифитной микрофлоры являются *гнилостные* бактерии, которые развиваются преимущественно в аэробных условиях.

Они расщепляют сахара, белки, молочную кислоту, и тем самым снижают питательную ценность и безопасность кормов, а также вследствие образования таких веществ как индол, кадаверин и скатол [1, 2]. *Маслянокислые* бактерии развиваются только в бескислородной среде, благоприятными условиями для них

являются низкое содержание сахаров, высокая влажность и содержание протеина. В результате катаболизма белков, углеводов и энергии происходят высокие потери питательных веществ. Органолептические показатели корма ухудшаются вследствие накопления масляной кислоты, аммиака, сероводорода, а образование токсичных аминов из белков приводит к снижению безопасности кормов [1, 3]. Дрожжи (*Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulophis*) являются факультативными анаэробами, обладают высокой устойчивостью к температуре и низким значениям кислотности, ведут сбраживание сахаров до спирта, а молочной кислоты до этилового спирта и углекислого газа. Дрожжи создают условия для раскисления среды, что благоприятно для развития маслянокислой и гнилостной микрофлоры. Негативное воздействие дрожжей заключается в больших потерях энергии силоса и высоком содержании спирта [1, 4]. Плесневые грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Helminthosporium*) развиваются в аэробных условиях, для роста и развития используют сахара, а при их недостатке молочную и уксусную кислоты. Продукты жизнедеятельности плесневых грибов оказывают подщелачивающее действие на корм, а синтезируемые микотоксины оказывают негативное действие на организм животных. Плесневые грибы продуцируют такие микотоксины как охратоксины, Т-2 токсин, зеараленон, вомитоксин, афлатоксины, совместное присутствие которых усиливает действие друг друга. Микотоксины не разрушаются при термической обработке кормов и накапливаются в мясе, яйцах и молоке, поэтому представляют особую опасность [1, 5].

Методами борьбы против возбудителей маслянокислого брожения являются быстрое подкисление растительной массы и удаление из нее излишней влаги. Для подавления гнилостных бактерий требуется хорошая герметизация растительных масс и быстрое подкисление сырья [1, 6].

Эффективной мерой против нежелательных микроорганизмов является применение биологических препаратов (биоконсервантов), например, на основе молочнокислых бактерий, и использование химических веществ, в основном на основе низкомолекулярных органических кислот, как индивидуально, так и их смесей, солей. Низкомолекулярные органические кислоты такие как муравьиная, уксусная, пропионовая, молочная, бензойная оказывают бактерицидное и бактериостатическое действие на широкий спектр нежелательных микроорганизмов [1–4].

Наиболее часто в качестве консервантов для предотвращения порчи зерновых и травянистых масс с целью подавления роста технически вредных и патогенных микроорганизмов используют муравьиную, пропионовую, молочную и бензойную кислоты. Содержание некоторых органических кислот, например, масляной, нежелательно, а содержание уксусной кислоты не должно превышать содержание молочной кислоты, так как содержание молочной кислоты в корме ниже 50% по отношению к сумме всех органических кислот свидетельствует о недоброкачественности корма [7–9].

Низкомолекулярные органические кислоты получают различными способами, однако использование кислот, полученных путем промышленного биосинтеза имеет ряд преимуществ ввиду их бактериального происхождения.

Гетероферментативные молочнокислые и пропионовокислые бактерии синтезируют комплекс низкомолекулярных органических кислот, таких как молочная, уксусная, янтарная, пропионовая, муравьиная, масляная, фумаровая и другие. Органические кислоты синтезируются в результате микробного метаболизма естественным путем либо при создании специальных условий при промышленном культивировании соответствующих бактерий (целенаправленное воздействие неблагоприятных факторов при культивировании микроорганизмов, создание «стрессовых условий») [10–12].

Сущность промышленного микробиологического синтеза органических кислот заключается в процессе ферментативного преобразования органических соединений в целевые метаболиты, которые представляют из себя промежуточные либо конечные продукты метаболизма. К первичным метаболитам обычно относятся небольшие молекулы, которые необходимы для нормального роста, развития и размножения микроорганизмов (аминокислоты, органические кислоты, спирты, нуклеотиды и ферменты). После прекращения роста некоторые микроорганизмы производят вторичные метаболиты, которые не используются для роста. Вторичный метаболизм приводит к образованию разнообразных, часто видоспецифичных конечных продуктов, таких как алкалоиды, антибиотики, токсины и некоторые пигменты [10, 13, 14].

Промышленный биосинтез органических кислот периодическим путем культивирования затрудняется неспособностью гетероферментативных молочнокислых и пропионовокислых бактерий расти в простых синтетических средах, потребностью в факторах роста в питательной среде, невозможностью в ходе ферментации нейтрализовывать образующиеся кислоты, ингибированием роста бактерий продуктами биосинтеза. Для эффективного биосинтеза органических кислот бактериями, которые не подвергаются генетическому редактированию и лабораторной адаптивной эволюции, необходимо использовать полноценные питательные среды, тщательно отбирать штаммы-продуценты, также задача получения целевых метаболитов усложняется при «классическом культивировании», без использования проточных реакторов, иммобилизованных клеток, использования стрессовых факторов [10, 15–17].

При культивировании бактерий, не подвергшихся генетическому редактированию и модификации, периодическим способом возможно получение культуральной жидкости с содержанием органических кислот до 20% вследствие ингибирования бактерий продуктами метаболизма, отсутствием регенерации среды и невозможностью нейтрализации образующихся кислот, что может быть решено подбором селективных, строго определенных условий и тщательным отбором штаммов-продуцентов [5, 10]. Стимулирующим воздействием на биосинтез органических кислот может быть изменение соотношения содержания в среде источников биогенных элементов, необходимых для сбалансированного роста микроорганизмов. Дефицит таких элементов как азот или фосфор лимитирует накопление биомассы при избыточном содержании в среде источника углерода, синтез кислот продолжается при наличии углеродсодержащего субстрата в среде и прекращается при ингибировании микроорганизмов, продуцируемыми кислотами [18–21].

**Материалы и методы.** В работе использовали стандартные микробиологические методы исследований. Определение содержания уксусной, масляной и молочной кислот проводили согласно СТБ 1223-2000 «Силос из кормовых растений. Общие технические условия».

Объектами исследований являлись культуральные жидкости гетероферментативных бактерий из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мяско-молочной промышленности»: *Lactobacillus fermentum* 2650 TL-O; *Leuconostoc falkenbergense* 2915 МН-ОГ; *Leuconostoc citreum* 2978 МН-ОГ; *Propionibacterium* 2016 МНО-К. Культивирование проводили в среде MRS в течение 24 часов при оптимальных для культур температурных режимах.

**Результаты и их обсуждение.** В Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мяско-молочной промышленности» поддерживаются штаммы молочнокислых, пропионовокислых бактерий, которые характеризуются различным уровнем кислотообразования. Для

оценки уровня биосинтеза органических кислот гетероферментативными микроорганизмами: молочнокислыми и пропионовокислыми бактериями было проведено определение содержания молочной, уксусной и масляной кислот, как наиболее важных при оценке качества сырья в кормопроизводстве. Содержание органических кислот в культуральных жидкостях гетероферментативных бактерий представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание органических кислот в культуральных жидкостях гетероферментативных бактерий

№ п/п	Культуры бактерий	Кислота	Содержание, %
1	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2650 TL-O	уксусная	5,97
		молочная	10,40
		масляная	0
2	<i>Leuconostoc falkenbergense</i> 2915 MH-OG	уксусная	5,19
		молочная	6,08
		масляная	0
3	<i>Leuconostoc citreum</i> 2978 MH-OG	уксусная	6,58
		молочная	10,13
		масляная	0
4	<i>Propionibacterium shermanii</i> 2016 МНО-К	уксусная	2,90
		молочная	1,64
		масляная	0

Источник данных: собственная разработка.

При определении кислот в культуральных жидкостях гетероферментативных молочнокислых бактерий установлено содержание уксусной кислоты на уровне 5,19–6,58%, молочной кислоты – 6,08–10,40%, в культуральной жидкости пропионовокислых бактерий (штамм 2016 МНО-К) уксусная кислота содержалась в количестве 2,90%, а молочная – 1,64%. Также установлено, что в процессе культивирования исследуемые штаммы микроорганизмов не синтезировали масляную кислоту.

**Выводы.** Перспективным для решения проблем, возникающих при заготовке растительных масс и зерновых культур, связанных с развитием нежелательной эпифитной микрофлоры, является использование органических кислот микробного происхождения ввиду их безопасности. Культуральные жидкости гетероферментативных молочнокислых и пропионовокислых бактерий содержат различные продукты биосинтеза, включая органические кислоты и могут использоваться для различного целевого назначения, в том числе, в кормопроизводстве для консервации зерновых и травянистых масс (при соответствующей обработке).

В культуральных жидкостях гетероферментативных бактерий установлен уровень содержания органических кислот, который делает возможным их использование для консервирования растительных масс и зернового сырья, а отсутствие масляной кислоты свидетельствует о желательной направленности процесса биосинтеза органических кислот.

Также актуальным является установление уровня синтеза и других органических кислот помимо масляной, уксусной и молочной, а также выбор методов обработки культуральных жидкостей гетероферментативных микроорганизмов, обуславливающих их применение в качестве консервирующих агентов для растительных масс, которые будут изучены на последующих этапах работы.

## Список использованных источников

1. Мухитов, А. А. Бактериальная микрофлора при силосовании / А. А. Мухитов и др. // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. – 2021. – С. 148-151.
2. Сайко, С. Г. Ветеринарно-санитарная оценка сочных кормов на наличие микотоксинов / С. Г. Сайко, Ю. В. Пьянкова // Обеспечение технологического суверенитета АПК: подходы, проблемы, решения: актуальные проблемы ветеринарной медицины: сб. ст. Международ. науч.-метод. конференц. – 2023. – С. 159-160.
3. Соляник, Т. В., Гласкович М. А. Микробиология. Микробиология кормов животного и растительного происхождения: курс лекций. – Горки: БГСХА. – 2014. – 76 с.
4. Лаптев, Г. В. Предотвращаем вторичную ферментацию и аэробную порчу силоса / Г. В. Лаптев [и др.] // Животноводство России. – 2024. – С. 52-54.
5. Чечина, О. Н. Общая биотехнология: учебное пособие для вузов / О. Н. Чечина. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2020. – 266 с.
6. Токарев, В. С. Кормление сельскохозяйственных животных. Кормовые средства (характеристика и использование): учеб.-метод. пособие для студентов по специальности «Ветеринарная медицина» / В. С. Токарев, Л. И. Лисунова. – Витебск: ВГАВМ. – 2023. – 195 с.
7. Лютых, О. Особенности выбора консервантов при заготовке кормов для сельскохозяйственных животных / О. Лютых, // Эффективное животноводство. – 2020. – №. 3. – С. 40-46.
8. Gheller, L. S. Different organic acid preparations on fermentation and microbiological profile, chemical composition, and aerobic stability of whole-plant corn silage / L.S. Gheller [et al.] // Animal Feed Science and Technology. – 2021. – Т. 281. – С. 115083.
9. Сорокин, С. Подкислители кормов: применять или нет? / С. Сорокин // Эффективное животноводство. – 2021. – №. 4. – С. 87-89.
1. Muhitov, A. A. Bakterial'naya mikroflora pri silosovanii [Bacterial microflora during silage] / A. A. Muhitov i dr. // Aktual'nye problemy infekcionnoj patologii i biotekhnologii. – 2021. – S. 148-151.
2. Sajko, S. G. Veterinarno-sanitarnaya ocenka sochnyh kormov na nalichie mikotoksinov [Veterinary and sanitary assessment of succulent feed for the presence of mycotoxins]/ S. G. Sajko, YU.V. P'yankova // Obespechenie tekhnologicheskogo suvereniteta APK: podhody, problemy, resheniya: aktual'nye problemy veterinarnoj mediciny [Ensuring technological sovereignty of the agro-industrial complex: approaches, problems, solutions: current problems of veterinary medicine]: sb. st. Mezhdunar.j nauch.-metod. konferenc. – 2023. – S. 159-160.
3. Solyanik, T. V., Glaskovich M. A. Mikrobiologiya. Mikrobiologiya kormov zhivotnogo i rastitel'nogo proiskhozhdeniya [Ensuring technological sovereignty of the agro-industrial complex: approaches, problems, solutions: current problems of veterinary medicinekurs]: kurs lekcij. – Gorki: BGSKHA. – 2014. – 76 s.
4. Laptev, G. V. Predotvrashchaem vtorichnuyu fermentaciyu i aerobnuyu porchu silosa [Preventing secondary fermentation and aerobic spoilage of silage] / G. V. Laptev [i dr.] // ZHivotnovodstvo Rossii. – 2024. – S. 52-54.
5. CHEchina, O. N. Obshchaya biotekhnologiya uchebnoe posobie dlya vuzov [General Biotechnology: A Textbook for Universities] / O. N. CHEchina. – 3-e izd., pererab. i dop. – M.: Izdatel'stvo YUrajt, 2020. – 266 s.
6. Tokarev, V. S. Kormlenie sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. Kormovye sredstva (harakteristika i ispol'zovanie) [Feeding of farm animals. Feed products (characteristics and use)]: ucheb.-metod. posobie dlya studentov po special'nosti «Veterinarnaya medicina» / V. S. Tokarev, L. I. Lisunova. – Vitebsk: VGAVM. – 2023. – 195 s.
7. Lyutyh, O. Osobennosti vybora konservantov pri zagotovke kormov dlya sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh / O. Lyutyh, // Effektivnoe zhivotnovodstvo. – 2020. – №. 3. – S. 40-46.
9. Sorokin, S. Podkisliteli kormov: primenyat' ili net? / [Feed acidifiers: to use or not to use?] / S. Sorokin // Effektivnoe zhivotnovodstvo. – 2021. – №. 4. – S. 87-

10. Propionic acid production from apple pomace in

11. Bhalla, T. C. Production of metabolites, industrial enzymes, amino acid, organic acids, antibiotics, vitamins and single cell proteins/ T. C. Bhalla, N.N. Sharma, M. Sharma // Food and industrial microbiology. – 2007. – 171005.

12. Алешина, Е. С. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса: учебное пособие / Е.С. Алешина, Е.А. Дроздова, Н. А. Романенко // Оренбург: – 2017. – 192 с.

13. Промышленные способы биотехнологического получения и выделения молочной кислоты / Самуйленко А. Я. и др. //Вестник Казанского технологического университета. – 2017. – Т. 20. – №. 4. – С. 123-126.

14. Sathesh-Prabu. C., Lee. S. K. Bioproduction of propionic acid using levulinic acid by engineered *Pseudomonas putida* / R. Tiwari [et al.] // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Т. 10. – С. 939248.

15. Abedi E., Hashemi S. M. B. Lactic acid production-producing microorganisms and substrates sources-state of art // Heliyon. – 2020. – Т. 6. – №. 10.

16. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar /. Mas A. [et al.] //The Scientific World Journal. – 2014. – Т. 2014.

17. Yadav P. et al. Organic acids: microbial sources, production, and applications //Functional foods and nutraceuticals in metabolic and non-communicable diseases. – Academic Press, 2022. – С. 325-337.

18. Fed-batch fermentation for propionic, acetic and lactic acid production / Ahmadi N. [et al.] //Oriental Journal of Chemistry. – 2015. – Т. 31. – №. 1. – С. 581.

19. Fermentation of milk whey permeate with different dairy propionibacteria strains / Antone U. [et al.] //Rural Development: Proceedings of the International Scientific Conference. – 2021. – С. 1-7.

20. Propionic acid production from apple pomace in

bioreactor using *Propionibacterium freudenreichii*: an economic analysis of the process / Piwowarek K. [et al.] //3 Biotech. – 2021. – Т. 11. – С. 1-15.

21. Шпак, Т. И. Продукты микробного брожения и метаболизма / Т.И Шпак // Новые информационные технологии как основа эффективного инновационного развития: сборник статей Международной научно-практической конференции: Калуга. – 2021. – С. 62-64.

12. Aleshina, E. S. Kul'tivirovanie mikroorganizmov kak osnova biotekhnologicheskogo processa: uchebnoe posobie [Cultivation of microorganisms as a basis for biotechnological process: a tutorial] / E. S. Aleshina, E. A. Drozdova, N. A. Romanenko // Orenburg: – 2017. – 192 s.

13. Promyshlennye sposoby biotekhnologicheskogo polucheniya i vydeleniya molochnoj kisloty [Industrial methods of biotechnological production and isolation of lactic acid] / Samujlenko A. YA. i dr. //Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. – 2017. – Т. 20. – №. 4. – С. 123-126.

21. Шпак, Т. И. Продукты микробного брожения и метаболизма [Products of microbial fermentation and metabolism] / Т. И Шпак // Новые информационные технологии как основа эффективного инновационного развития [New information technologies as a basis for effective innovative development]: sbornik statej

Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj  
konferencii]: Kaluga. – 2021. – S. 62-64.