

*И.А. Сидерко, Н.К. Жабанос, к.т.н., доцент, А.В. Везицкая,
М.М. Мистейко, к.в.н., доцент, Е.Н. Бирюк, к.с.-х.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ БИОСИНТЕЗА ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ КУЛЬТУРАМИ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

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

STUDY OF THE LEVEL OF ORGANIC ACID BIOSYNTHESIS BY PROPIONIC ACID BACTERIA CULTURES

*e-mail: myirinka718@gmail.com, nzhabanos@tut.by, alexandravez@mail.ru, 7535562@mail.ru,
biohimbel@yandex.by*

В статье представлены данные о снижении кислотности питательной среды культурами пропионовокислых бактерий, определен интервал максимального кислотообразования относительно прироста оптической плотности среды, определен профиль утилизации источников углерода культурами пропионовокислых бактерий, который представлен широким спектром моно- и дисахаридов, а также трисахаридом раффинозой и многоатомными спиртами. Установлены уровни содержания органических кислот после культивирования в среде на основе фугата гомоферментативных молочнокислых бактерий, содержащих молочную кислоту: муравьиной 1,5-5,9 г/л, молочной 0,2-4,9 г/л, уксусной 0,1-4,0 г/л, янтарной 0,4-2,9 г/л, пропионовой 3,2-10,3 г/л, а также отмечено снижение содержания молочной кислоты на 0,3-28,6 г/л.

The article presents data on the reduction of the acidity of the nutrient medium by cultures of propionic acid bacteria. The period of maximum acid production relative to the increase in the optical density of the medium was determined. The profile of carbon source utilization by propionic acid bacteria cultures was also established and was shown to include a broad range of mono- and disaccharides, as well as the trisaccharide raffinose and polyhydric alcohols. The concentrations of organic acids after cultivation in a medium based on the fugate of homofermentative lactic acid bacteria containing lactic acid were determined: formic acid, 1.5–5.9 g/L; lactic acid, 0.2–4.9 g/L; acetic acid, 0.1–4.0 g/L; succinic acid, 0.4–2.9 g/L; propionic acid, 3.2–10.3 g/L. A decrease in lactic acid content by 0.3–28.6 g/L was also observed.

Ключевые слова: пропионовокислые бактерии, активная кислотность, оптическая плотность, органические кислоты, пропионовая кислота.

Key words: propionic acid bacteria, active acidity, optical density, organic acids, propionic acid.

Введение. Пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium*) – это каталазоположительные, грамположительные, анаэробные, аэротолерантные бактерии, которые синтезируют пропионовую кислоту в качестве основного продукта путем ферментации углеродных субстратов [1]. Пропионовокислые бактерии могут быть использованы как в технологиях получения и обогащения определенных групп продуктов питания, пробиотических биологически активных добавок, так и в качестве микроорганизмов-продуцентов пропионовой кислоты, ферментов, витаминов группы В. Пропионовая кислота находит широкое применение в качестве консервирующего агента, а также как сырье в химическом синтезе полимеров. Вместе с тем, пропионовая кислота, получаемая способом микробиологического биосинтеза, является более безопасным [2–4].

Кроме пропионовой кислоты, пропионовокислые бактерии продуцируют уксусную, янтарную кислоту, углекислый газ и другие продукты метаболизма. В качестве источника углерода для пропионовокислых бактерий наиболее благоприятна

глюкоза, вместе с этим, пропионовокислые бактерии способны к ферментации лактозы, лактата, пирувата и глицерина [1]. Биосинтез кислот зависит от состава и свойств питательной среды, природы углеродного субстрата в ее составе, концентрации ионов водорода, а также внешних условий: температуры, наличия кислорода, способа культивирования, однако, главное условие – это активность микроорганизма-продуцента [1, 5].

Следует отметить, что кислотообразование культур пропионовокислых бактерий может зависеть не только от индивидуальных свойств штамма и условий культивирования, также при биосинтезе органических кислот пропионовокислыми бактериями важным фактором является продолжительность культивирования [5, 6].

Целью настоящих исследований являлось установление уровня биосинтеза органических кислот штаммами пропионовокислых бактерий при различных параметрах культивирования *in vitro*.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись культуральная жидкость, получаемая при культивировании штаммов бактерий рода *Propionibacterium* Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности», а именно:

- *Propionibacterium shermanii* 2016 МНО-К,
- *Propionibacterium freudenreichii* 2017 МНО-К,
- *Propionibacterium freudenreichii* 2018 МНО-К,
- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 2388 МНО-К.

Культуры пропионовокислых бактерий вносили в количестве 1,0 % в питательную среду ПГС (7,20 ед. рН) и культивировали при температуре 32°C. Определяли значения оптической плотности и активной кислотности среды через 1, 4, 6, 8, 10 суток.

Определение профиля утилизации углеводов проводили при внесении 2,0 % инокулята пропионовокислых бактерий в питательную среду (бульон), содержащую индикатор бромкрезоловый пурпурный и диск с источником углерода, учитывая изменение цвета среды после термостатирования.

Оптическую плотность (ОП) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре Solar в пластмассовых кюветах толщиной 1,0 см при длине волны 540 нм, относительно нуля – оптической плотности среды.

Определение активной кислотности среды проводили по ГОСТ 32892-2014.

Определение органических кислот проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 (диодно-матричное детектирование в УФ-области, колонка обращеннофазная C-18, длиной 250 мм, диаметр 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, с рабочим диапазоном 2,0-7,5 ед. рН), количественное содержание органических кислот определяли методом абсолютной градуировки (внешнего стандарта) с помощью программного обеспечения к хроматографу UltiMate 3000.

Для исследований использовали следующие среды:

- среда на основе сыворотки: 3 %-ный раствор сыворотки подсырной деминерализованной (СД-90), доводили до 7,45 ед. рН и стерилизовали при температуре (95±2)°C 20 мин,
- среда на основе мелассы: 5 %-ный раствор мелассы стерилизовали при температуре (112±1)°C 12 мин,
- среда на основе глицерина: 3 %-ный раствор глицерина стерилизовали при температуре (112±1)°C 12 мин,
- среда Ф1: стерильный фугат среды накопления гомоферментативных молочнокислых палочек,
- среда Ф2: стерильный фугат среды накопления гомоферментативных термофильных стрептококков,

– среда Ф3: стерильный фугат среды накопления гомоферментативных мезофильных лактококков.

Результаты и их обсуждение. Изменение оптической плотности и активной кислотности питательной среды при развитии культур пропионовокислых бактерий представлено на рисунке 1.

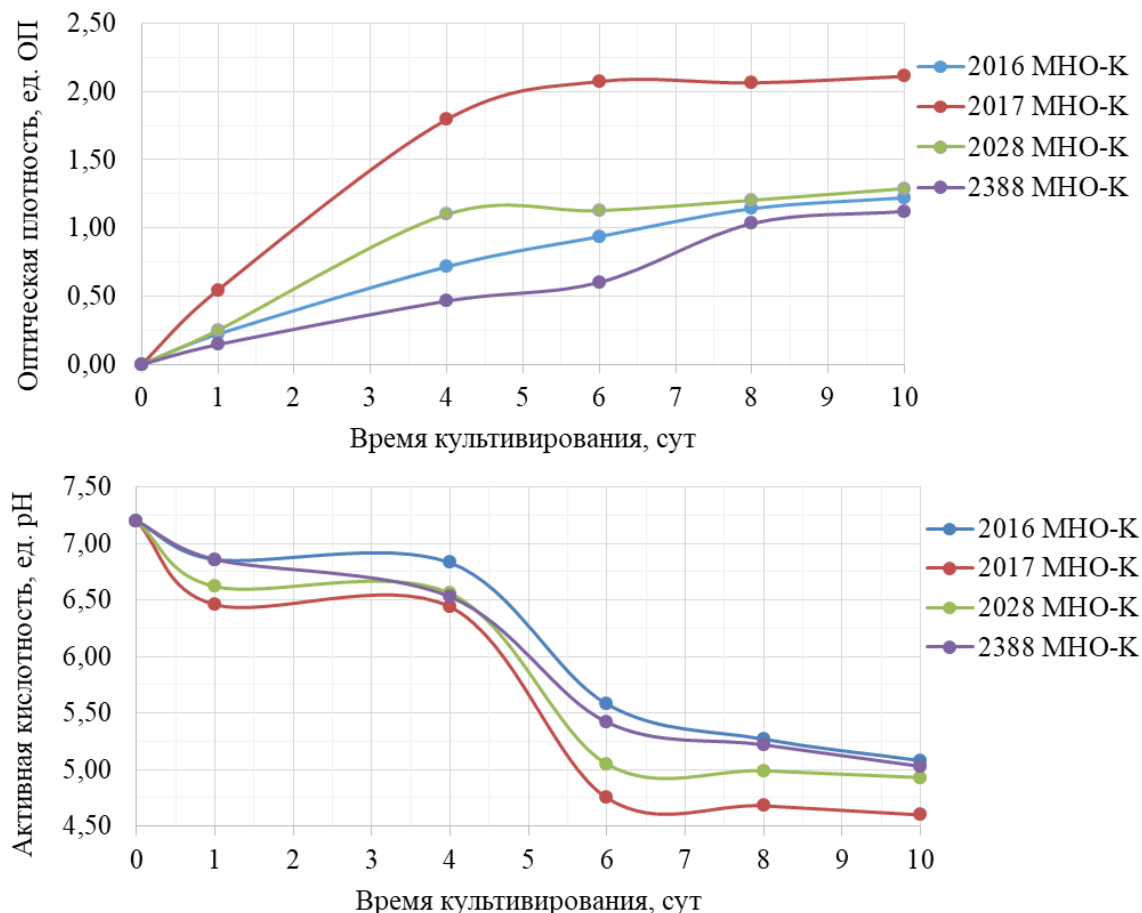


Рисунок 1 – Прирост оптической плотности и снижение активной кислотности среды при развитии культур пропионовокислых бактерий

Источник данных: собственная разработка.

При культивировании штаммов пропионовокислых бактерий отмечено, что через сутки культивирования оптическая плотность среды достигала уровня 0,145–0,545 ед. ОП, через четверо суток – 0,464–1,759 ед. ОП, через 6 суток – 0,601–2,063 ед. ОП, через 8 суток – 1,032–2,074 ед. ОП, через 10 суток – 1,122–2,111 ед. ОП. При этом отмечен постепенный прирост оптической плотности культуральной жидкости, получаемой при культивировании штаммов 2016 МНО-К и 2388 МНО-К пропионовокислых бактерий в течение 10 суток, а при культивировании штаммов 2017 МНО-К и 2028 МНО-К – замедление прироста оптической плотности культуральной жидкости после четырех суток.

Установлено, культуры пропионовокислых бактерий снижали кислотность питательной среды через сутки культивирования до уровня 6,46–6,86 ед. рН, через четверо суток – 6,44–6,83 ед. рН, через 6 суток – 4,75–5,58 ед. рН, через 8 суток – 4,68–5,27 ед. рН, через 10 суток – 4,60–5,08 ед. рН. Таким образом, активная кислотность питательной среды снижалась за первые – четвертые сутки культивирования на 0,37–0,76 ед. рН, через 6 суток - на 1,62–2,45 ед. рН, через 8 суток – на 1,93–2,52 ед. рН, через 10 суток – на 2,12–2,60 ед. рН. Максимальное снижение

кислотности среды при культивировании пропионовокислых бактерий наблюдали с четвертых по шестые сутки. Считаем целесообразным для получения максимального уровня биосинтеза органических кислот проводить культивирование пропионовокислых бактерий в течение пяти суток.

Вместе с тем, выявлено снижение активной кислотности питательной среды при развитии штамма 2017 МНО-К в течение всего времени культивирования, а прирост оптической плотности при этом возрастал, в сравнении аналогичными показателями культуральных сред других исследуемых штаммов пропионовокислых бактерий, что может быть связано с видовой принадлежностью данного штамма.

Таким образом, при различном характере накопления клеток пропионовокислых бактерий наблюдалась тенденция к максимальному снижению кислотности среды с четвертых по шестые сутки культивирования, что дает возможность оценки оптимального времени культивирования пропионовокислых бактерий с целью получения органических кислот. Однако, при изменении условий культивирования и состава питательной среды для культивирования продуцентов кислотообразования и накопление клеточной массы может происходить с иной скоростью, что требует дальнейших уточнений.

Важной характеристикой при изучении биохимических свойств культур-продуцентов является оценка их способности использовать различные вещества в качестве источников углерода: моно-, дисахаридов, многоатомных спиртов. Для оценки возможности использования в составе питательных сред различных источников углерода определена сахаролитическая способность культур пропионовокислых бактерий. Оценку развития культур проводили визуально по изменению окрашивания питательной среды, содержащей индикатор, через 5 суток культивирования. Способность пропионовокислых бактерий утилизировать различные источники углерода при развитии в питательной среде представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Сахаролитический профиль пропионовокислых бактерий

№ п/п	Источник углерода	Культуры <i>Propionibacterium</i>			
		2016 МНО-К	2017 МНО-К	2018 МНО-К	2388 МНО-К
1	арабиноза	+	+	+	+
2	галактоза	+	+	+	+
3	глюкоза	+	+	+	+
4	манноза	+	+	+	+
5	фруктоза	+	+	+	+
6	лактоза	-	+	+	+
7	мальтоза	+	+	+	+
8	сахароза	+	+	+	+
9	трегалоза	+	+	+	+
10	раффиноза	+	+	+	+
11	глицерин	-	+	+	+
12	маннит	+	+	+	+
13	инулин	-	-	-	-
14	сорбитол	-	-	-	-

Примечание: «+» - источник углерода ферментируется;

«-» - источник углерода не ферментируется.

Источник данных: собственная разработка.

Культуры пропионовокислых бактерий 2017 МНО-К, 2018 МНО-К, 2388 МНО-К развивались в питательной среде, где источником углерода выступали глюкоза, галактоза, лактоза, сахароза, мальтоза, раффиноза, арабиноза, трегалоза, манноза, фруктоза, маннит, глицерин.

При этом, все исследованные культуры пропионовокислых бактерий проявили неспособность ферментировать многоатомный спирт сорбитол и полисахарид инулин.

Культивирование штамма пропионовокислых бактерий 2016 МНО-К в среде с лактозой и глицерином не приводило к снижению кислотности питательной среды, достаточной для изменения цвета индикатора, что может быть связано с видовой принадлежностью штамма.

Широкий спектр утилизируемых пропионовокислыми бактериями источников углерода дает возможность потенциального использования множества питательных сред. Для исследований были отобраны три питательные среды, состоящие из побочных продуктов производства сыра, сахара и химического синтеза, перспективные для культивирования штаммов-продуцентов: сыворотка молочная (источник углерода – лактоза), раствор мелассы (источник углерода – сахароза), раствор глицерина (таблица 2).

Таблица 2 – Активная кислотность питательных сред, состоящих из побочных продуктов производства сыра, сахара и химического синтеза, после культивирования штаммов-продуцентов

Штамм пропионовокислых бактерий	Активная кислотность, ед. рН		
	питательной среды на основе		
	сыворотки	мелассы	глицерина
2016 МНО-К	5,18	6,54	4,98
2017 МНО-К	5,29	5,86	4,77
2018 МНО-К	5,31	5,64	4,71
2388 МНО-К	5,26	5,69	4,88
контроль	6,27	7,60	5,10

Источник данных: собственная разработка.

Результаты исследований, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что развитие штаммов пропионовокислых бактерий приводило к снижению активной кислотности среды на основе сыворотки на 0,96–1,09 ед. рН, а при культивировании в среде на основе мелассы – на 1,06–1,96 ед. рН, глицерина – на 0,22–0,54 ед. рН. Отмечено, что активная кислотность питательных сред на основе побочных продуктов производства сыра, сахара и химического синтеза изначально имела разное значение, связанное с химической природой компонентов, что затрудняло дать объективную достоверную оценку ее изменений, однако, наибольшие значения снижения активной кислотности выявлено в среде на основе мелассы.

Следует отметить, что после культивирования штамма 2016 МНО-К, в питательной среде на основе сыворотки значения активной кислотности определялись ниже по сравнению с остальными питательными средами. Несмотря на то, что данная культура не ферментирует лактозу, но ферментирует лактат-ионы, содержащиеся в сыворотке, этот эффект наблюдался и на пятые сутки культивирования.

В связи с этим, для получения пропионовой кислоты из побочных продуктов биотехнологического производства перспективной питательной средой для культивирования пропионовокислых бактерий является фугат культуральных жидкостей молочнокислых бактерий. В фугате содержатся остатки компонентов питательной среды, метаболиты жизнедеятельности культивируемых бактерий, включая молочную кислоту, необходимую для роста пропионовокислых бактерий.

Проведены исследования по установлению уровней биосинтеза пропионовокислыми бактериями органических кислот в средах, содержащих молочную кислоту и ее соли: фугаты после культивирования гомоферментативных молочнокислых бактерий. В таблице 3 представлены значения активной кислотности

сред после культивирования культур пропионовокислых бактерий через 5 суток культивирования.

Таблица 3 – Активная кислотность питательных сред после культивирования пропионовокислых бактерий

№ п/п	Культура	Активная кислотность, ед. рН		
		Ф1	Ф2	Ф3
1	2016 МНО-К	5,09	5,25	5,67
2	2017 МНО-К	5,11	5,24	5,53
3	2018 МНО-К	5,11	5,27	5,72
4	2388 МНО-К	5,11	5,25	5,53
5	контроль	5,13	5,29	5,80

Источник данных: собственная разработка.

После культивирования пропионовокислых бактерий в среде на основе фугата (Ф 1), полученного при культивировании гомоферментативных молочнокислых палочек (лактобалл), активная кислотность достоверно снижалась на 0,02–0,04 ед. рН, в среде на основе фугата (Ф 2) термофильного стрептококка – на 0,02–0,05 ед. рН, в среде на основе фугата (Ф 3) гомоферментативных мезофильных лактококков - на 0,08–0,27 ед. рН по сравнению с контролем. Таким образом, установлено, что культивирование штаммов *Propionibacterium* приводило к незначительному снижению кислотности питательной среды, что связано с ферментацией лактат-ионов в ней и биосинтезу пропионовой и янтарной кислот. Данные результаты подтверждены уровнем содержания органических кислот в исследуемых культуральных жидкостях.

Установлено, что для пропионовокислых бактерий наиболее характерно продуцирование пропионовой, уксусной и янтарной кислот, а также их способность к биосинтезу ряда других соединений.

В таблице 4 представлены результаты определения уровня биосинтеза муравьиной, уксусной, пропионовой, молочной и янтарной кислот после культивирования пропионовокислых бактерий в фугате гомоферментативных бактерий (Ф 3).

Таблица 4 – Уровень биосинтеза органических кислот пропионовокислыми бактериями, культивируемыми в Ф 3

№ п/п	Культура/среда	Наименование кислоты	Содержание кислоты, г/л		
			Ф1	Ф2	Ф3
1	2	3	4	5	6
1.1	Среда фугат (Ф 3)	молочная	21,6	24,3	34,4
2.1	2016 МНО-К	муравьиная	не обн.	1,5	3,6
		молочная	26,5	23,5	27,6
		уксусная	0,9	0,1	1,2
		янтарная	не обн.	1,7	1,7
		пропионовая	не обн.	не обн.	3,2
2.2	2017 МНО-К	муравьиная	1,5	5,9	3,7
		молочная	26,3	24,0	19,3
		уксусная	0,6	не обн.	3,0
		янтарная	не обн.	не обн.	0,4
		пропионовая	не обн.	0,4	7,0

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6
2.3	2018 МНО-К	муравьиная	не обн.	3,4	1,5
		молочная	25,9	22,0	5,8
		уксусная	0,6	не обн.	4,0
		янтарная	не обн.	0,5	2,9
		пропионовая	не обн.	0,8	10,3
2.4	2388 МНО-К	муравьиная	1,7	2,7	-
		молочная	26,2	24,5	8,4
		уксусная	1,5	не обн.	3,5
		янтарная	1,0	1,9	2,6
		пропионовая	не обн.	не обн.	9,0

Источник данных: собственная разработка.

В питательной среде на основе фугата гомоферментативных молочнокислых палочек (Ф 1) содержание молочной кислоты после культивирования культур пропионовокислых бактерий увеличивалось на 19,9–22,7 % (4,3–4,9 г/л), пропионовой кислоты не обнаружено. В фугате термофильного стрептококка (Ф 2) отмечено снижение либо увеличение количества молочной кислоты на 0,8–3,3% (0,2–0,8 г/л) в зависимости от штамма, пропионовую кислоту образовали только культуры *Propionibacterium* 2017 МНО-К и *Propionibacterium* 2018 МНО-К в количестве 0,4 и 0,8 г/л соответственно. При культивировании пропионовокислых бактерий в среде на основе фугата гомоферментативных мезофильных лактококков (Ф 3) установлено снижение уровня молочной кислоты на 19,8–83,1% (6,8–28,6 г/л) и увеличение содержания пропионовой кислоты в количестве 3,2–10,3 г/л.

Анализ изменений содержания органических кислот в питательных средах на основе фугатов после культивирования пропионовокислых бактерий показал, что использование фугата гомоферментативных мезофильных лактококков в качестве питательной среды приводило к образованию преимущественно пропионовой кислоты и снижению содержания молочной. Наиболее активным продуцентом пропионовой кислоты является культура *Propionibacterium freudenreichii* 2018 МНО-К (10,3 г/л).

Выводы. В результате настоящих исследований установлен профиль утилизации источников углерода культурами пропионовокислых бактерий, который представлен широким спектром моно- и дисахаридов, а также трисахаридом раффинозой и многоатомными спиртами. Определен оптимальный состав питательных сред и условия культивирования пропионовокислых бактерий для проведения эффективного биосинтеза органических кислот. Установлен активный продуцент органических кислот – *Propionibacterium freudenreichii* 2018 МНО-К, перспективный для промышленного получения пропионовой кислоты.

Научные исследования проведены по НИР 2 «Изучение условий эффективного биосинтеза органических кислот штаммами гетероферментативных микроорганизмов и их комбинациями» задания 5.11. подпрограммы «Продовольственная безопасность» государственной программы научных исследований «Сельскохозяйственные технологии и продовольственная безопасность», 2021-2025 годы.

Список использованных источников

1. Propionic Acid Fermentation – Study of Substrates, Strains, and Antimicrobial Properties / A. Unigunde, I. Ciprovia, M. Zolovs [et al.] // Fermentation. – 2023. – № 9. – P. 26.

2. Орлова, Т. Изучение биологической активности пропионовокислых бактерий / 2. Orlova, T. Izuchenie biologicheskoy aktivnosti propionovokisly`kh bakterij [Study of the biological

- Т. Орлова // The scientific heritage. – 2021. – № 79-2. – С. 31–33.
3. Propionic acid: method of production, current state and perspectives / V. Ranaei, Z. Pilevar, A. Khaneghah [et al.] // Food technology and biotechnology. – 2020. – Vol. 58, № 2. – P. 115–127.
4. Пильникова, С. Д. Характеристика и использование молочно- и пропионовокислых бактерий в молочной промышленности / С. Д. Пильникова, А. В. Степанов // «АПК - молодёжь, наука, инновации» : материалы VII Всероссийской науч.-практич. конференц., г. Махачкала, 21–22 мая 2023 г. / Дагестанский гос. тех. ун.; редкол.: Ш.М. Минатуллаев (отв. ред.) [и др.]. – Махачкала, 2023. – С. 251–256.
4. Pil'nikova, S. D., Kharakteristika i ispol'zovanie molochno- i propionovokisly'kh bakterij v molochnoj promy'shennosti [Characteristics and use of lactic and propionic acid bacteria in the dairy industry] / S. D. Pil'nikova, A. V. Stepanov // «AIC - youth, science, innovation»: Proceedings of the VII All-Russian scientific and practical conference, Makhachkala, May 21-22, 2023 / Dagestan State Technical University; editorial board: Sh. M. Minatullaev (editor-in-chief) [et al.]. – Makhachkala, 2023. – P. 251–256.
5. Propionic acid production from food waste in batch reactors: Effect of pH, types of inoculum, and thermal pre-treatment / R. Ali, F. Saravia, A. Hille-Reichel [et al.] // Bioresource technology. – 2021. – V. 319. – P. 124–166.
6. Microbial propionic acid production / R. A. Gonzalez-Garcia, T. McCubbin, L. Navone [et al.] // Fermentation. – 2017. – V. 3, №. 2. – P. 21.