

На правах рукописи



Дерунец Алиса Сергеевна

**Биологические основы совершенствования
культивирования молочнокислых бактерий для
разработки высокоэффективной технологии
получения молочной кислоты**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева».

Научный руководитель

Кузнецов Александр Евгеньевич

кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии РХТУ имени Д. И. Менделеева

Официальные

Стоянова Лидия Григорьевна

оппоненты:

доктор биологических наук, доцент кафедры микробиологии, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии микробов биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»

Исакова Елена Павловна

кандидат биологических наук, с.н.с., заместитель зав. лабораторией экологической и эволюционной биохимии института биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Тамбовский государственный технический университет (ФГБОУ ВО ТГТУ), г. Тамбов

Защита состоится «15» декабря 2020 г. в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ имени Д. И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д. И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат диссертации разослан «_____» 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Д 999.095.03, к.т.н.



И. В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время молочная кислота используется во многих отраслях промышленности: косметической, текстильной, фармацевтической, пищевой, химической, при синтезе биodeградируемых полимеров, некоторых органических растворителей и ряда ценных химических соединений. Однако широкое распространение молочной кислоты и получаемых из нее продуктов сдерживается относительно высокой их себестоимостью.

На сегодняшний день наиболее рациональным способом получения молочной кислоты считается микробиологический синтез при помощи молочнокислых бактерий. Традиционно молочную кислоту получают при помощи периодического культивирования молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus*, используя комплексные питательные среды с аминокислотами, витаминами и другими факторами роста, источником которых служат разнообразные растительные, животные, дрожжевые гидролизаты и экстракты. Как правило, применяется дрожжевой экстракт, вносящий существенный вклад в себестоимость молочной кислоты. Недостатками простого периодического культивирования является низкая скорость брожения, а также образование при последующей нейтрализации и выделении молочной кислоты значительного количества отхода в виде сульфата кальция.

Ранее на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева был разработан процесс биосинтеза молочной кислоты с использованием мембранного биореактора, в котором ведется культивирование молочнокислых бактерий на питательной среде с глюкозой в отъемно-доливном режиме и без отвода клеток продуцента из зоны реакции. Было показано, что в таком режиме можно обеспечить стабильную высокую продуктивность мембранного биореактора – до 50 г/(л*ч) и более, что в десятки раз превышает продуктивность реактора при простом периодическом культивировании. Вместе с тем, в разработанном процессе по-прежнему необходимо использовать питательную среду, богатую дорогостоящими ростовыми факторами. Высокоинтенсивное длительное культивирование в мембранном биореакторе предполагает устойчивое протекание процесса биосинтеза, низкую чувствительность к контаминации, невысокую чувствительность к перерывам в подаче питательной среды, к повышенным концентрациям субстратов и продуктов, возможным кратковременным повышениям температуры, т.е. к воздействию стрессорных факторов.

В ходе исследований, также проведенных на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева, было показано, что рациональным способом совершенствования микробиологического синтеза может быть управление стрессовыми воздействиями, в частности, оптимальное сочетание стрессорных и антистрессорных факторов. Такой подход получил название контролируемого стресса, частным примером которого является контролируемый оксидативный стресс, использующий воздействие малых доз пероксида водорода и видимого света низкой интенсивности на популяцию продуцентов. Такие воздействия в ряде случаев позволяют существенно улучшить показатели биосинтеза.

Настоящая работа выполнялась на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы», проект «Разработка новой отечественной комплексной технологии получения полилактида (биоразлагаемого полимера), базирующейся на биокаталитической переработке сахаросодержащего сырья», соглашение о предоставлении субсидии от 05.06.2014 г. №14.577.21.0037, рег. № 114111140107.

Целью исследования являлась разработка биологических основ для совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты применительно к высокоинтенсивным методам культивирования, с оптимизацией условий молочнокислого брожения, прежде всего с точки зрения снижения затрат на ростовые факторы в питательной среде, повышением

устойчивости популяции продуцента к стрессовым воздействиям, рациональным управлением стрессом.

Для реализации данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определение основных характеристик и показателей процесса культивирования молочнокислых бактерий с отобранным продуцентом *p. Lactobacillus*.
2. Оптимизации состава питательной среды, прежде всего с точки зрения замены дорогостоящего дрожжевого экстракта на менее дорогие источники азота и ростовых факторов.
3. Определение границ устойчивости процесса (влияние голодания, концентрации субстрата, протока среды, рН).
4. Изучение влияния стрессовых условий на изменение характеристик культуры молочнокислых бактерий, в частности, в условиях контролируемого оксидативного стресса, осмотического стресса и теплового шока.
5. Определение благоприятных условий культивирования при комбинированном действии оксидативного стресса и видимого света низкой интенсивности.
6. Разработка рекомендаций к совершенствованию биосинтеза молочной кислоты применительно к использованию высокоинтенсивных и малозатратных ферментационных процессов, в частности, мембранного биореактора.

Основные подходы к совершенствованию микробиологического синтеза молочной кислоты заключаются в следующем:

- **Получение базовых показателей культивирования** на стандартной питательной среде с наиболее доступными углеводными субстратами (глюкозой, сахарозой, мелассой).

- **Оптимизация питательной среды** с целью снижения затрат на ростовые факторы за счет снижения их стоимости и подбора их альтернативного источника, а также рационального состава минеральных компонентов питательной среды.

- **Управляемое культивирование микроорганизмов** с использованием контролируемого стрессового воздействия, позволяющее обеспечить сохранение биосинтетической стабильности продуцента в условиях голодания по субстрату, пониженной концентрации ростовых факторов, повышенной плотности популяции, снижения рН, теплового и осмотического шока, ингибирующего действия молочной кислоты.

Научная новизна. Впервые на примере продуцента *Lactobacillus paracasei* В 4079 изучены процессы культивирования молочнокислых бактерий и биосинтеза молочной кислоты с точки зрения рационального сочетания состава питательной среды и направленного и контролируемого стрессового воздействия на популяцию клеток продуцента.

Показано, что для совершенствования ферментационных процессов получения молочной кислоты контролируемое воздействие стрессорных факторов (низких доз H_2O_2) и антистрессорных факторов (видимого света низкой интенсивности) может выступать в качестве средства для улучшения показателей биосинтеза с повышением выхода молочной кислоты на 2-5%, снижения содержания побочных продуктов биосинтеза и остаточных компонентов питания. Стрессированная пероксидом водорода культура становится чувствительной к воздействию небольших доз видимого света. Облучение видимым светом стрессированной культуры является необходимым условием для достижения положительных эффектов. Показано, что воздействие H_2O_2 обусловлено физиологическими эффектами, а не протеканием сопутствующих химических или фотохимических процессов окисления с участием H_2O_2 .

Практическая значимость. Установлены рациональные условия использования соевых гидролизатов в качестве альтернативы дрожжевому экстракту для получения молочной кислоты с помощью бактерий *Lactobacillus paracasei*, позволяющие снизить остаточное содержание компонентов питания и побочных продуктов биосинтеза. Последнее важно для снижения

себестоимости молочной кислоты, ее очистки и выделения, снижения потерь и повышения выхода получаемых из нее продуктов, в частности, полилактоида.

Разработаны рекомендации для совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты применительно к высокоинтенсивным и экономически рациональным методам культивирования, в частности, отъемно-доливному культивированию в мембранном биореакторе.

Методология и методы исследования. Культивирование микроорганизмов проводили с применением стандартных методов биотехнологии и микробиологии. Для биохимического и физико-химического анализа были использованы классические и современные методы. Оптимизация осуществлялась с применением математических методов планирования.

На защиту выносятся:

- результаты оптимизации питательной среды для увеличения выхода молочной кислоты и снижения ее стоимости при получении микробиологическим синтезом;
- результаты исследования контролируемого стрессового воздействия для улучшения показателей биосинтеза молочной кислоты;
- рекомендации для обеспечения высокой физиологической активности продуцента, в частности, применительно к отъемно-доливному культивированию в мембранном биореакторе.

Достоверность результатов обеспечивается большим объемом экспериментальных данных, которые были получены с использованием современных аналитических методов исследований, и их статистической оценкой. Полученные результаты согласуются с литературными данными.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе на X, XI и XII Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, «МКХТ – 2014, 2015, 2016»), на Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014), на Российско-Швейцарском семинаре «От фундаментальных исследований к коммерциализации научных идей» (Москва, 2016), на Конкурсе молодых ученых «Прикоснись к науке» в рамках Фестиваля науки в Менделеевском университете (Москва, 2016), на XVII Ежегодной молодежной конференции «Биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2017), на XII Международном биотехнологическом Форуме-выставке «РосБиоТех-2018» (Москва, 2018), 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018 (Вена, 2018).

Личный вклад автора состоял в сборе и анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментальной работы, последующей обработке и анализе результатов, подготовке материалов конференций и статей, а также представлении результатов работы на международных и российских конференциях и семинарах.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)», пункты 2, 3.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 1 статья в рецензируемых изданиях из перечня ВАК, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных SCOPUS и Web of Science, а также публикации в других изданиях (8 научных работ), подана 1 заявка на патент.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы, включающего 322 источника, в том числе 303 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 185 страницах машинописного текста, иллюстрирована 52 рисунками, 15 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость.

В первой главе приведен обзор научно-технической литературы, в котором проанализированы способы получения молочной кислоты, основные проблемы биосинтеза, повышающие себестоимость молочной кислоты, способы снижения себестоимости, например, оптимизация состава питательных сред, методы управляемого культивирования микроорганизмов, в частности контролируемое стрессовое воздействие.

Во второй главе изложена экспериментальная часть, основные объекты и методы исследования, а также их характеристика.

В третьей главе представлены результаты и их обсуждение. При изучении влияния основного компонента среды на биологическую активность штамма молочнокислых бактерий (МКБ) *L. paracasei subsp. paracasei* В 4079 было показано, что основным недостатком процесса получения молочной кислоты культивированием *L. paracasei* на свекловичной мелассе является низкая физиологическая активность данного штамма по отношению к сахарозе, что обуславливает необходимость поиска решений интенсификации процесса. Полагая, что процесс ассимиляции мелассы может быть лимитирован активностью фермента инвертазы, для интенсификации процесса брожения исследовали процесс культивирования данного штамма в периодических условиях ферментации на предобработанной питательной среде, результаты которых обобщены в табл. 1.

Таблица 1.

Основные показатели периодического культивирования *L. paracasei* с использованием предобработанной свекловичной мелассы.

Начальное содержание углеводов, г/л	120,0
Длительность лаг-фазы, ч	6,0
Длительность культивирования (до конца брожения), ч	20,5
Концентрация молочной кислоты, г/л	117,0
Продуктивность (по углеводам), г/л*ч	4,7
Удельная продуктивность, г/л*ч*опт. ед.	1,1
Концентрация углеводов (конеч.), г/л	3,8
Степень потребления углеводов, %	96,2
Выход МК, %	95,0

Гидролиз мелассы позволяет увеличить скорость брожения не менее чем в 2 раза по сравнению с негидролизованной мелассой и использовать предобработанную мелассу в качестве субстрата для получения молочной кислоты без значительного ухудшения основных показателей ферментации и без внесения минеральных компонентов питания (солей калия и магния, фосфатов).

Для определения возможности замены дрожжевого экстракта на альтернативный менее дорогой источник азота и факторов роста изучали рост *L. paracasei* В 4079 и синтез молочной кислоты на средах, содержащих гидролизаты сырья различной природы. При использовании гидролизатов количество дрожжевого экстракта в питательной среде заменялась на эквивалентное количество альтернативных источников азота.

На рис. 1. приведены кривые роста культуры *L. paracasei*, синтеза молочной кислоты и потребления углеводов на средах с дрожжевым экстрактом, гидролизатом соевой текстурированной муки и гидролизатом концентрата соевого белка, а в табл. 2. – сводные показатели культивирования *L. paracasei* на средах с использованными источниками азота и ростовыми факторами. При культивировании на средах, в которых в качестве источника

азота и ростовых факторов использовались гидролизат соевой текстурированной муки и гидролизат концентрата соевого белка, для культуры МКБ не было отмечено ни продолжительной lag-фазы, ни снижения бродильной активности. Существенной разницы в скорости накопления биомассы также не наблюдалось по сравнению с культивированием

при использовании дрожжевого экстракта (рис.1).

Выход молочной кислоты при этом составил 85,5% для культивирования с использованием гидролизата соевой текстурированной муки и 80,5%, для варианта с использованием гидролизата концентрата соевого белка; продуктивность по молочной кислоте - 0,75 г/л×ч и 0,46 г/л×ч соответственно, что свидетельствует о возможности использования данных источников азота в составе комплексных сред для получения молочной кислоты. При использовании в качестве источника ростовых факторов куриного пептона при культивировании МКБ количество жизнеспособных клеток на конец процесса составляло всего лишь 1×10^9 – на два порядка ниже по сравнению с дрожжевым экстрактом (8×10^{11}), что не позволяет рекомендовать его в качестве альтернативы дрожжевому экстракту.

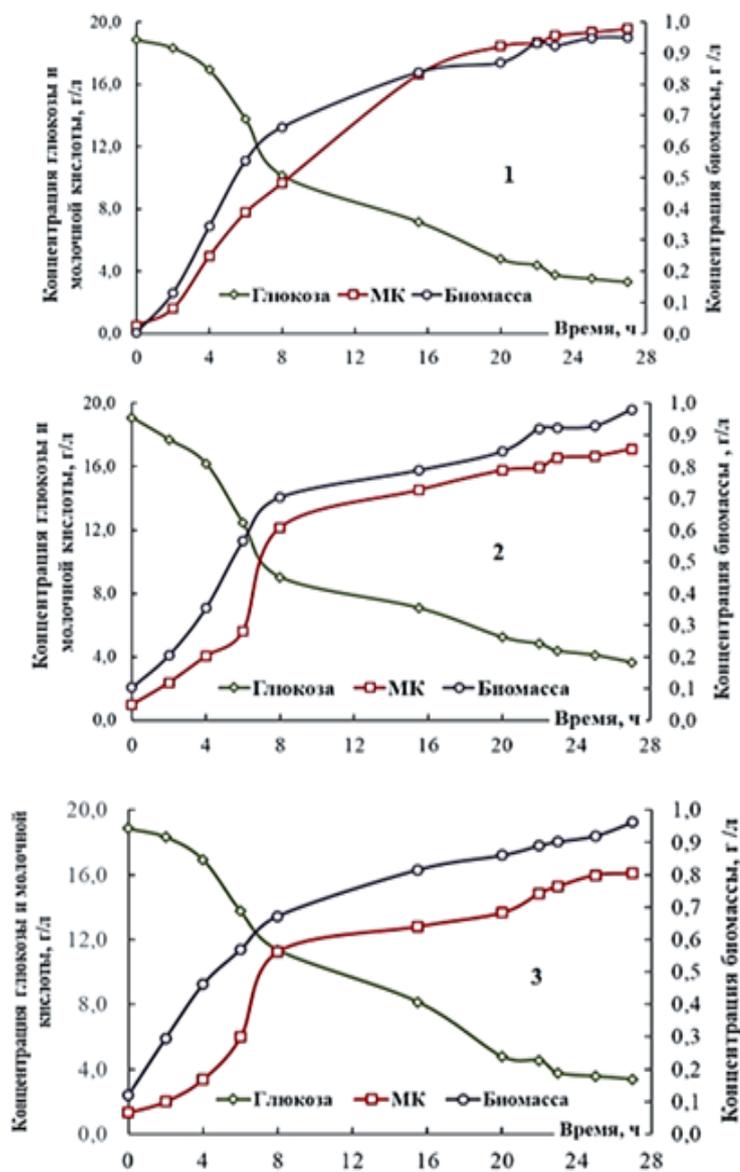


Рисунок 1. Культивирование *L. paracasei* на средах, содержащих дрожжевой экстракт (1), гидролизат соевой текстурированной муки (2), гидролизат концентрата соевого белка (3).

На рис. 2. приведена сравнительная хроматограмма образцов полученной культуральной жидкости штамма *L. paracasei* при использовании в качестве источника азота дрожжевого экстракта и гидролизата соевой текстурированной муки. Следует отметить, что при использовании соевых источников культуральная жидкость имеет тот же компонентный состав, что и при использовании дрожжевого экстракта, однако в первом случае нецелевые компоненты содержатся в существенно меньших количествах, что важно для последующего выделения молочной кислоты. Кроме того, соевый гидролизат существенно дешевле, чем дрожжевой экстракт – рыночная стоимость соевого гидролизата находится в диапазоне от 1 до 3 долл. США/кг, в то время как рыночная стоимость качественного дрожжевого экстракта – от 10 до 30 долл. США/кг.

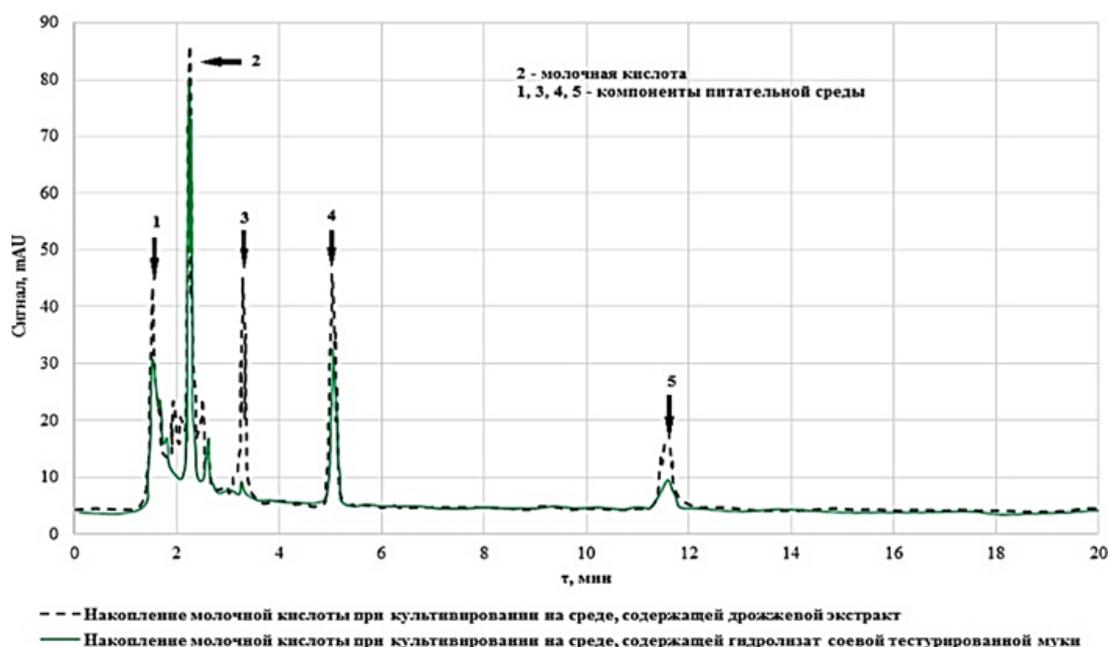


Рисунок 2. Хроматограмма образца культуральной жидкости, для культуры *L. paracasei* В4079 при росте на питательной среде, содержащей гидролизат соевой муки.

Таблица 2.

Показатели культивирования *L. paracasei* на средах с различными источниками азота и факторов роста.

Источник, №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Показатель												
Начальное содержание углеводов (глюкоза), г/л	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Продолжительность культивирования, ч	27	27	27	34	34	41	41	31	31	31	29	29
Концентрация биомассы, г/л	0,95	0,98	0,96	2,2	2,25	0,55	0,56	0,79	0,88	0,93	1,12	0,85
Количество жизнеспособных клеток (на конец стационарной фазы), КОЕ/мл	8×10^{11}	$7,9 \times 10^{11}$	7×10^{11}	1×10^9	1×10^{11}	$7,4 \times 10^8$	$4,9 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^{10}$	6×10^{10}	9×10^{10}	$1,4 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$
Остаточное содержание углеводов, г/л	3,3	3,7	3,4	5,3	7,3	12,2	12,6	10,4	8,7	10,6	4,5	10,1
Степень потребления углеводов, %	83,5	81,5	83	73,5	63,5	39	37	48	56,5	47	77,5	49,5
Концентрация молочной кислоты, г/л	19,5	17,1	16,1	17,3	13,7	9,9	10,1	15,3	11,7	12,1	12,7	12,2
Продуктивность, г/л×ч	0,9	0,75	0,63	0,62	0,56	0,23	0,15	0,84	0,94	0,39	0,43	0,37
Выход продукта, %	97,5	85,5	80,5	86	68,5	49,5	50,5	76,5	58,5	60,5	63,5	61

Примечание: 1. Дрожжевой экстракт; 2. Гидролизат соевой текстурированной муки; 3. Гидролизат концентрата соевого белка; 4. Куриный пептон; 5. Частично гидролизованные лиофилизированные кормовые дрожжи; 6. Пептон из рыбьей чешуи; 7. Соевый пептид; 8. Дегидрированный соевый соус; 9. Соевый олигопептид; 10. Кукурузный пептид; 11. Гидролизат концентрата белка, полученного из обезвоженной соевой муки методом спиртовой промывки; 12. Гидролизат олигопептидов сои.

По результатам вышеприведенных исследований для дальнейшей работы в качестве источника азота и факторов роста был выбран гидролизат соевого белкового концентрата.

Дальнейшие исследования по рационализации состава питательной среды проводили с использованием полного факторного эксперимента (ПФЭ). Концентрации компонентов питательной среды (г/л) варьировались следующим образом: глюкоза (X_1) – 10–30; источник факторов роста (X_2) – 5–15; K_2HPO_4 (X_3) – 1–3; $MgSO_4$ (X_4) – 0,05–0,15; $MnSO_4$ (X_5) – 0,05–0,075.

Результаты ПФЭ показали, что, как и ожидалось, на конверсию субстрата и, следовательно, выход молочной кислоты, помимо концентраций глюкозы (основной

субстрат) и источника ростовых факторов оказывает существенное влияние концентрация ионов Mn^{2+} . С полученной моделью, функцией отклика в которой является конверсия субстрата, была проведена стандартная процедура исключения незначимых коэффициентов на основании 3 параллельных опытов по культивированию МКБ в центре плана с использованием критерия Стьюдента ($P < 0.05$), после чего уравнение приняло вид:

$$\hat{Y} = 80.86 - 4.64X_1 + 8.6X_2 + 5.95X_3 - 1.3X_4 + X_5 + 4.55X_1X_3 - 1.02X_1X_4 - 1.8X_2X_4 - 1.18X_2X_5 - 1.74X_3X_5 - 1.3X_1X_2X_3 + 0.97X_2X_3X_5 + 1.53X_1X_2X_3X_5$$

Поверхности представляют собой трехмерную модель, поэтому для анализа пяти переменных было построено несколько поверхностей отклика, чередуя три параметра, принимаемых за константу.

Используя полученные поверхности отклика, определили оптимальные значения концентраций компонентов питательной среды при концентрации глюкозы 20 г/л: концентрация источника факторов роста – 10 г/л, K_2HPO_4 – 2 г/л, $MgSO_4$ – 0.1 г/л, $MnSO_4$ – 0.075 г/л.

Целью второй части исследования являлось изучение воздействия оксидативного стресса на физиолого-биохимические характеристики молочнокислых бактерий *L. paracasei subsp. paracasei* В 4079, как варианта управляемого культивирования при микробиологическом синтезе молочной кислоты.

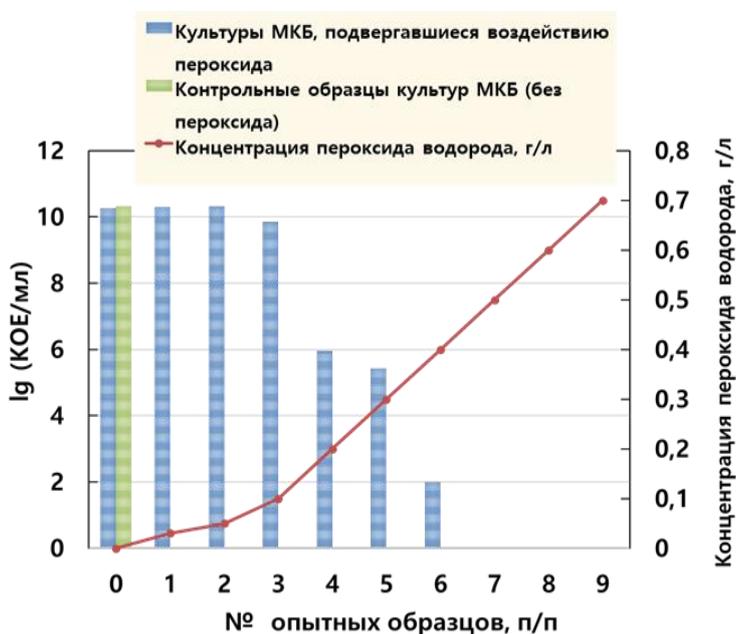


Рис. 3. Определение сублетальной концентрации пероксида водорода.

Оксидативный стресс вызывали внесением в питательную среду сублетальных доз пероксида водорода. С целью определения сублетальной дозы провели культивирование штамма *L. paracasei* В 4079 в колбах с варьированием концентрации вносимого H_2O_2 в интервале от 0,05 г/л до 3 г/л с шагом в 0,05–0,1 единиц. H_2O_2 вносили в среду с культурой, находящейся в фазе замедленного роста, концентрация субстрата (глюкозы) при этом составляла 10–12% от начальной концентрации. Из рис. 3 следует, что сублетальной для данной культуры молочнокислых бактерий при использованных условиях культивирования является концентрация пероксида водорода 0,2–0,3 г/л.

Как было показано ранее на кафедре биотехнологии РХТУ на примере получения этанола с помощью дрожжей-сахаромицетов (Кузнецов и др., 2005; Калёнов, 2007), положительные эффекты при использовании методики контролируемого оксидативного стресса наблюдаются лишь для линий микроорганизмов, преадаптированных к оксидативному воздействию в условиях культивирования с освещением содержимого биореакторов видимым светом. Поэтому в экспериментах с молочнокислыми бактериями также необходимо было иметь линии МКБ, адаптированные к внесению H_2O_2 . Для их получения провели последовательное пассирование линий продуцента в колбах на среде с низкой (30 г/л) и высокой (200 г/л) концентрацией глюкозы. Культивирование проводилось как на свету (C_1 – C_3), так и в темноте (T_1 – T_3). H_2O_2 вносили в количестве 0,3 г/л при

наступлении фазы замедленного роста (при стандартных условиях культивирования – на 18-ый час) после пересева в С₁ – С₃ и Т₁ – Т₃. Параллельно вели контрольные линии МКБ, пассируемые на той же среде на свету и в темноте, но без внесения Н₂О₂ (С_{1к} - С_{3к} и Т_{1к} - Т_{3к}). Поскольку у МКБ функционирует механизм фоторепарации, впервые среди микроорганизмов обнаруженный в 1959 г. именно у *L. casei* (Srittmatter, 1959) и весьма вероятен перекрестный ответ на разные стрессовые воздействия, ведение линий на свету и в темноте представлялось вполне обоснованным.

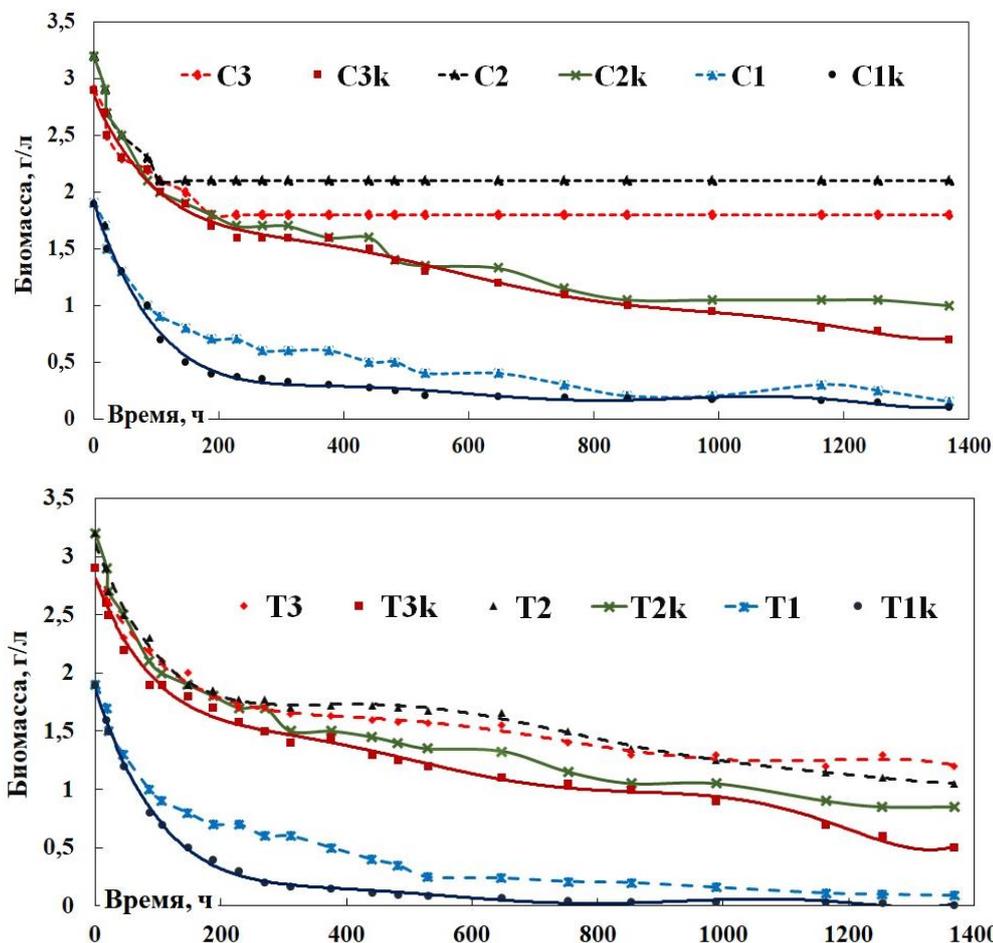


Рис.4.Изменение конечного уровня накопления биомассы на среде с 30 г/л глюкозы при культивировании на свету (сверху) и в темноте (снизу) по мере увеличения количества пассажей при внесении и без внесения Н₂О₂ (среднее время культивирования в каждом пассаже составляло 48 ч).

Результаты экспериментов показали, что освещение является значимым фактором при пересевах с внесением Н₂О₂. В условиях полной темноты (линии Т) во всех вариантах ведения линий с внесением Н₂О₂ рост МКБ был нестабильным, клетки зачастую лизировали, однако достаточно было рассеянного дневного освещения в некоторых линиях (С₃–С₅), чтобы накопление биомассы стабилизировалось (рис. 4).

Таким образом, на свету молочнокислые бактерии адаптируются к действию Н₂О₂, накапливают существенно больше биомассы, чем в контроле, и в этих условиях проявляют чувствительность к свету.

Одновременно при ведении пассажей наблюдалось повышение конечного уровня накопления молочной кислоты в стрессированных линиях по сравнению с контрольными (рис. 5), при этом на свету это повышение было более явным.

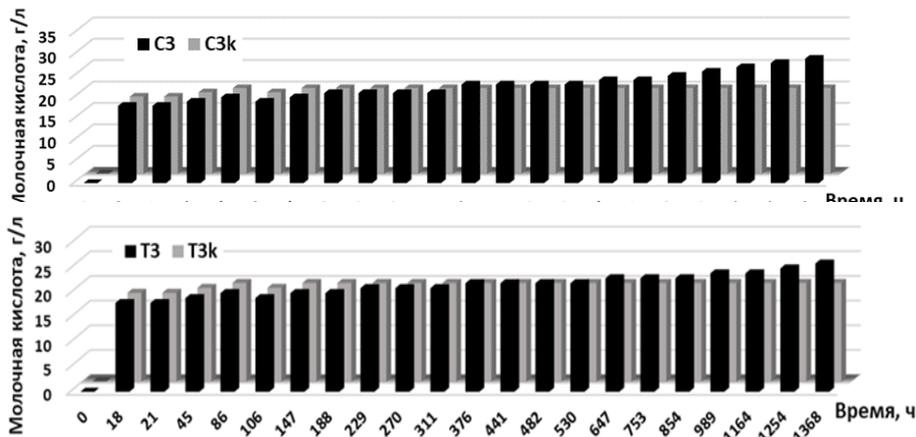


Рис.5. Изменение конечной концентрации молочной кислоты при культивировании молочнокислых бактерий *L. paracasei* на свету и в темноте по мере увеличения количества пассажей при внесении (C₃, T₃) и без внесения (C_{3к}, T_{3к}) H₂O₂. Концентрация глюкозы в исходной среде 30 г/л.

Теоретически можно было бы предположить, что возникновение чувствительности к свету стрессированной культуры кажущееся и обусловлено интенсивным протеканием процессов фотохимического окисления компонентов питательной среды пероксидом водорода при освещении питательной среды, что приводит к устранению его токсичного воздействия. Чтобы проверить такое предположение, проводился «холостой» эксперимент. В этом эксперименте среда с компонентами питания и добавленными 0,3 г/л пероксида водорода предварительно выдерживалась в стерильных условиях в течение 24 час на свету и в темноте, после чего вносился инокулят (выращенная на среде MRS адаптированная культура 22 пассажа).

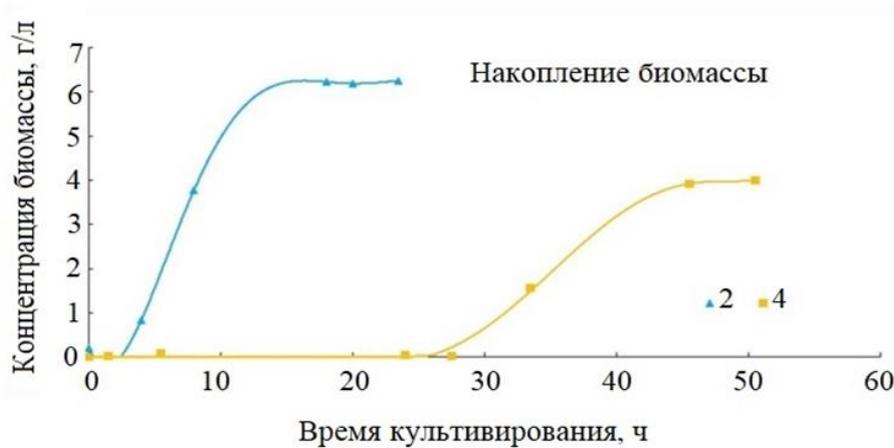
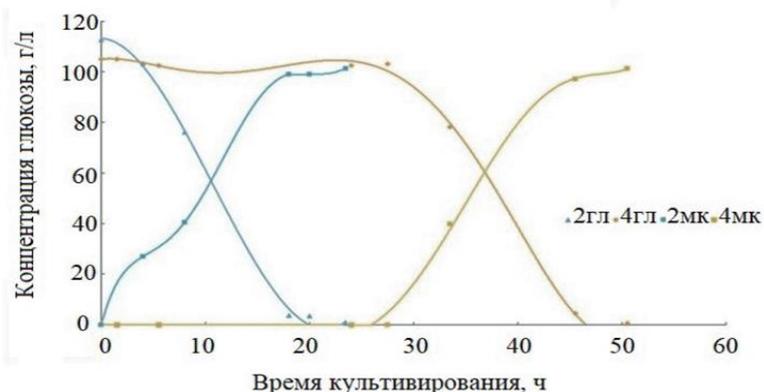


Рис.6. Показатели процесса при культивировании стрессированной линии на свету (2) и в темноте (4) в условиях «холостого» эксперимента. Точка «0» на оси абсцисс соответствует моменту внесения инокулята.

Потребление глюкозы и накопление молочной кислоты в ходе культивирования



Результаты эксперимента представлены на рис. 6. Видно, что различия между ростом на свету и в темноте сохраняются: наблюдается существенное торможение роста и биосинтеза молочной кислоты – до 30 час включительно – при использовании преадаптированной к внесению H_2O_2 линии, но выращиваемой после засева в ферментере в условиях темноты, по сравнению с ростом на свету, т.е. эффект обусловлен не модификацией питательной среды в результате протекания фотохимических реакций окисления, а связан именно с биологическими фоточувствительными процессами.

С целью определения скорости потери устойчивости стрессированной культуры к оксидативному стрессу провели пассирование стрессированной линии в колбах на свету и в темноте без добавления пероксида водорода. Контролем служили нестрессированные линии, для которых также проводилось пассирование с использованием и без использования освещения. Одновременно в каждом пассаже отбирались аликвоты стрессированной суспензии без добавления H_2O_2 из колб на свету и в темноте, и, с использованием плоскодонных 96-ти луночных планшетов, проводились тестовые острые опыты на устойчивость к внесению 0,3 г/л пероксиду водорода.

На рис. 7 представлены кривые конечных уровней накопления биомассы и уровня pH по ходу пассирования для вариантов культивирования на свету и в темноте. Видно, что для контрольных линий освещение не играет существенной роли – кривые накопления биомассы и pH – профили практически идентичны для вариантов культивирования на свету и в темноте. Для стрессированных вариантов линия на свету медленнее теряет устойчивость к пероксиду водорода, чем линия в темноте. Поскольку в данных экспериментах H_2O_2 в среду не вносился, наблюдаемое различие свидетельствует в пользу того, что положительное действие освещения стрессированной линии видимым светом обусловлено физиологическими и биохимическими различиями в популяциях на свету и в темноте, а не, например, различиями в скорости распада вносимого пероксида водорода в среде на свету и в темноте. Также видно, что чувствительность стрессированной линии к H_2O_2 без внесения последнего в среду культивирования к пятому пассажу приближается к чувствительности контрольной линии, поскольку различия в падении оптической плотности (OD) в острых опытах с внесением H_2O_2 по сравнению с контролем, явно выраженные для первого пассажа, становятся незначительными к пятому пассажу (рис. 8), т.е. к пятому пассажу происходит практически полная деадаптация популяции бактерий к оксидативному воздействию.

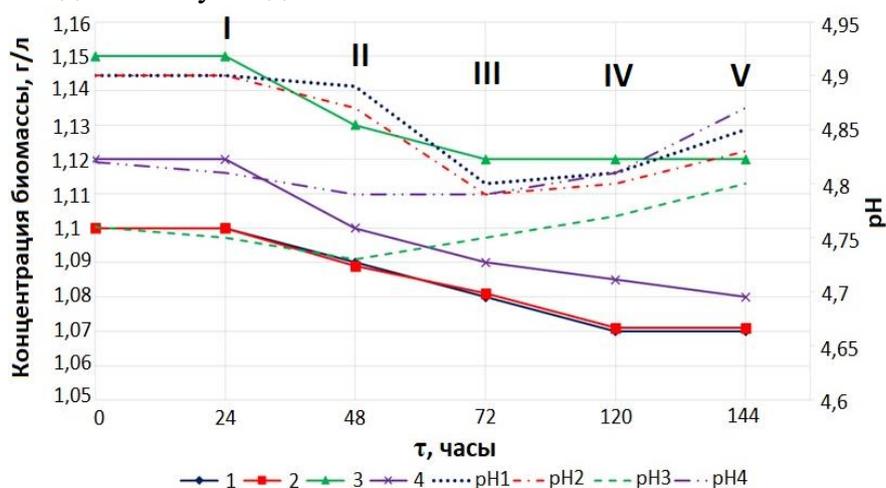
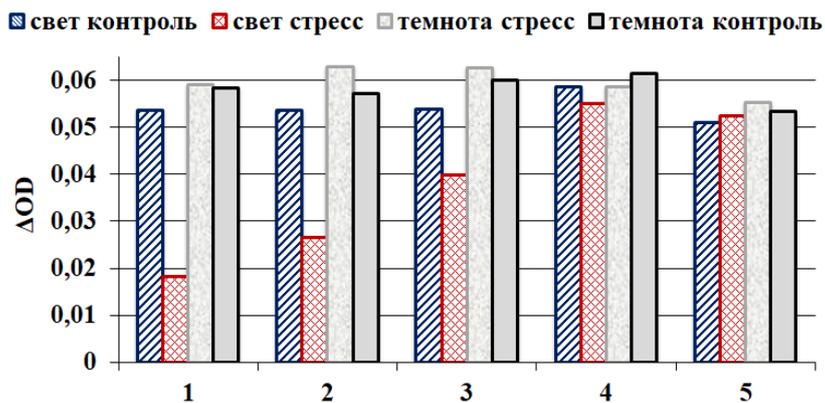


Рис. 7. Конечные уровни накопления биомассы и pH по ходу пассирования для вариантов культивирования на свету и в темноте (1 – контрольная линия, культивирование на свету, 2 – контрольная линия, культивирование в темноте, 3 – стрессированная линия, культивирование на свету, 4 – стрессированная линия, культивирование в темноте). Римские цифры – пассажи.

Рис. 8. Падение OD в аликвотах суспензии микроорганизмов для контрольной и стрессированной культур микроорганизмов при проведении тестовых острых опытов на устойчивость к перексиду водорода (пероксид водорода добавлялся в типичной сублетальной концентрации, время экспозиции составляло 1 час, 1- 5 – номера пассажиров; аликвоты отбирались в поздней стационарной фазе).



Задачей следующего этапа исследований являлось изучение перекрестных воздействий стресс-факторов. Наличие перекрестной адаптации к различным видам стресса расширяет возможности управляемого культивирования микроорганизмов, поддержания целевой физиологической и биохимической активности продуцента при отклонении режимов культивирования от регламентных.

Изучалось перекрестное воздействие между оксидативным стрессом и тепловым шоком, оксидативным стрессом и осмотическим шоком, и возникновение чувствительности популяции штамма *L. paracasei* В 4079 к видимому свету после стресса, не связанного с оксидативным. На рис. 9 представлены кривые потребления субстрата, накопления молочной кислоты и биомассы в ходе культивирования при воздействии теплового шока.

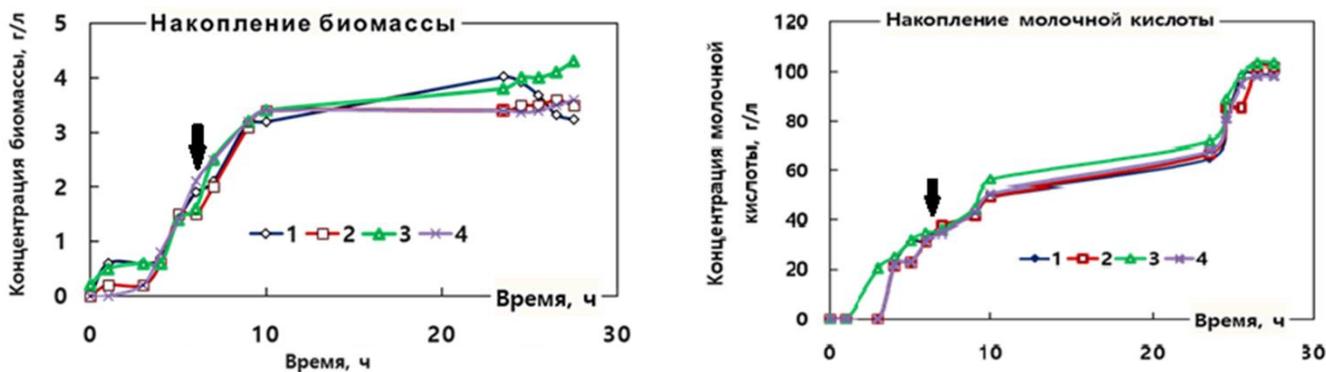


Рис. 9. Сопоставление показателей роста в условиях теплового шока: (импульсный подъем температуры обозначен стрелкой). 1. - неадаптированная к стрессу линия, освещения нет. 2. - неадаптированная к стрессу линия, используется источник дополнительного освещения. 3. - адаптированная к стрессу линия, используется источник дополнительного освещения. 4. - адаптированная к стрессу линия, освещения нет.

Видно, что кривые накопления молочной кислоты и потребления глюкозы для контрольных ферментаций на свету и в темноте не имеют существенных различий, то есть фактор освещения в данном случае не имеет значения при использовании линий, не подвергавшихся ранее оксидативному стрессу (т.е. неадаптированной культуры). При использовании же линий, адаптированных к оксидативному стрессу, скорость сбраживания субстрата заметно выше, особенно в условиях освещения ферментационной среды, о чем наиболее явно свидетельствуют кривые потребления глюкозы. Таким образом, используемая культура *L. paracasei* В 4079 имеет перекрестный ответ на оксидативный стресс, тепловой шок и, по-видимому, фоторепарацию.

Исследование лизатов стрессированной и нестрессированной культур МКБ с проведением электрофореза в SDS-ПААГ, показало (рис. 10, 11), что для всех образцов, вне

зависимости от условий культивирования и для всех вариантов стресса (оксидативного воздействия, осмотического шока, теплового шока), вне зависимости осуществлялось ли культивирование на свету или в темноте, характерно наличие белка молекулярной массой 54.2 кДа. Это также указывает на наличие перекрестного ответа при разных видах стресса, в котором участвует данный белок, т.е. он может являться важным фактором, играющим роль в стресс-ответе клетки. Различий же в варианте на свету и в темноте представленная электрофореграмма не выявила.

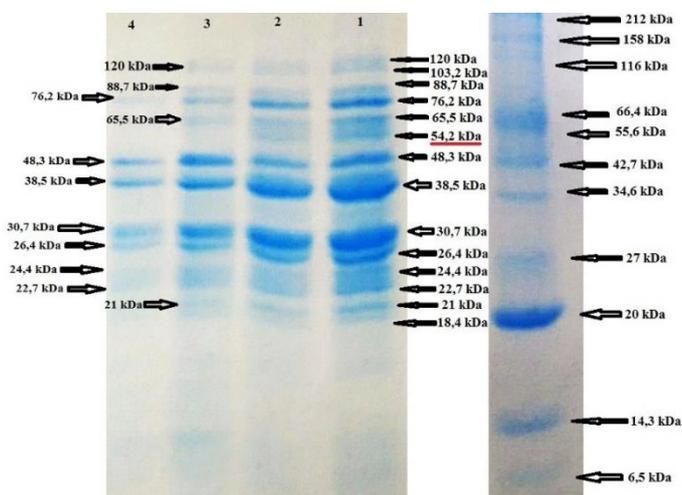
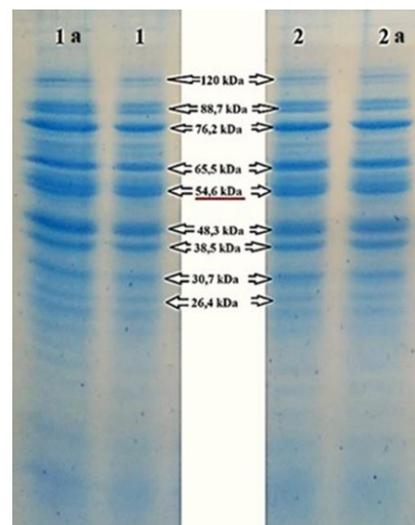


Рис. 10. Электрофореграмма внутриклеточного пула белков лактобацилл (окислительный стресс).

1 – преадаптированная к стрессу линия, культивирование в темноте;
 2 – преадаптированная линия, культивирование на свету;
 3 – неадаптированная линия, культивирование на свету;
 4 – неадаптированная линия, культивирование в темноте.

Рис. 11. Электрофореграмма внутриклеточного пула белков лактобацилл (тепловой и осмотический шок).

1 – лизаты клеток, подвергавшихся осмотическому шоку:
 1а – культивирование проводилось в темноте;
 1 – культивирование проводилось при освещении;
 2 – лизаты клеток, подвергавшихся тепловому шоку:
 2а – культивирование проводилось в темноте;
 2 – культивирование проводилось при освещении.



По результатам исследований были сделаны рекомендации для совершенствования процесса ферментации с получением молочной кислоты на основе продуцента *L. paracasei subsp. paracasei* В 4079: по оптимальному составу питательной среды (концентрация глюкозы – 100 г/л, ростовых факторов – 10 г/л, K_2HPO_4 – 2 г/л, $MgSO_4$ – 0,1 г/л, $MnSO_4$ – 0,075 г/л); по использованию свекловичной мелассы только после предварительной стадии ее гидролиза; по замене дрожжевого экстракта на относительно дешевые соевые гидролизаты; по использованию оптимального стрессового воздействия малых доз пероксида водорода с одновременным освещением видимым светом ферментационной среды с преадаптированными к оксидативному стрессу молочнокислыми бактериями. Последнее может повысить выход молочной кислоты на 3–5%, снизить содержание побочных внеклеточных продуктов метаболизма, повысить устойчивость культивирования при отклонении технологических параметров от оптимальных, например, при нарушении температурного режима в пределах субкритических значений.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность дальнейшего совершенствования ранее разработанного высокоинтенсивного, экономически и экологически рационального процесса биосинтеза молочной кислоты в мембранном биореакторе путем: предобработки углеводного субстрата, оптимизации состава питательной среды, источника ростовых факторов и контролируемого стрессового воздействия.
2. Дрожжевой экстракт, как дорогостоящий источник ростовых факторов для роста молочнокислых бактерий, может быть заменен на существенно более дешевые соевые гидролизаты.
3. Впервые для молочнокислых бактерий показано, что в условиях оксидативного воздействия пероксидом водорода микроорганизмы становятся чувствительными к видимому свету низкой интенсивности. В этих условиях возможно достижение положительных эффектов с точки зрения улучшения целевых показателей биосинтеза.
4. Необходимым условием для обеспечения положительных эффектов является процедура адаптации бактериальной популяции к сублетальным дозам стрессора (пероксида водорода) на фоне освещения питательной среды с клетками продуцента видимым светом низкой интенсивности (30-300 мВт/л).
5. В условиях сочетанного воздействия оптимальных доз пероксида водорода и видимого света низкой интенсивности наблюдается улучшение показателей биосинтеза при использовании культуры *Lactobacillus paracasei* В 4079, преадаптированной к оксидативному стрессу, а именно, повышение выхода молочной кислоты на 3-5%, снижение содержания побочных продуктов биосинтеза и остаточных компонентов питания, что важно для выделения и очистки молочной кислоты.
6. Показано, что культура молочнокислых бактерий *L. paracasei* В 4079, преадаптированная к оксидативному стрессу в условиях освещения питательной среды видимым светом, становится более устойчивой к тепловому шоку и осмотическому стрессу, т.е. в этих условиях наблюдается перекрестная адаптация к этим трем видам стрессорного воздействия. В условиях голодания и кислотного стресса явной перекрестной адаптации и положительных изменений в отношении роста и биосинтеза молочной кислоты не наблюдается.
7. Наблюдаемые положительные эффекты при культивировании адаптированной к пероксиду водорода линии молочнокислых бактерий в условиях освещения питательной среды видимым светом обусловлены биологическим воздействием пероксида водорода, а не протеканием фотохимических реакций.
8. В условиях оксидативного стресса, осмотического шока и теплового шока у адаптированной и неадаптированной к оксидативному стрессу культуры экспрессируется белок с молекулярной массой 54,2 кДа, что указывает на важную роль данного фактора в перекрестном стресс-ответе клетки, при этом различий в экспрессии данного белка в условиях освещения среды видимым светом и без освещения не выявлено.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации изданиях, индексируемых в международных базах данных:

1. Kuznetsov A., Beloded A., **Derunets A.**, Grosheva V., Vakar L., Kozlovskiy R., Shvets V. Biosynthesis of lactic acid in a membrane bioreactor for cleaner technology of polylactide production // Clean Technologies and Environmental Policy. 2017. № 19(3). P. 869-882.
2. **Derunets A. S.** Using of oxidative stress for improvement of lactic acid biosynthesis // 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018. Vol.18. 2018. P. 315 – 321.

Публикации в рецензируемых изданиях из перечня ВАК:

3. **Дерунец А. С.**, Шевченко И. А., Хабибулина Н. В., Белодед А. В., Кузнецов А. Е. Оптимизация состава питательной среды для микробиологического синтеза молочной кислоты бактериями *Lactobacillus paracasei* // Бутлеровские сообщения. 2017. Т.50, №5. С. 19-27.

Публикации в других изданиях:

4. **Дерунец А. С.**, Смирнова В. Д., Белодед А. В. Высокоплотностное непрерывное культивирование молочнокислых бактерий в мембранном биореакторе. Успехи в химии и химической технологии: сб. научных трудов. Том XXVII, № 8(148) М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2013. С. 105 -111.
5. **Дерунец А. С.**, Смирнова В. Д., Белодед А. В. Мембранная технология получения молочной кислоты на основе ферментации свекловичной мелассы / Международная научно-практическая конференция "Биотехнология и качество жизни", сб. мат. конф. / Департамент науки, промышленной политики и предпринимательства города Москвы. М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", 2014. С. 424- 425.
6. **Дерунец А. С.**, Грошева В. Д., Белодед А. В. Динамика популяции и физиологическое состояние культуры молочнокислых бактерий в условиях истощения субстрата и высоких концентраций молочной кислоты. Успехи в химии и химической технологии: сб. научных трудов. Том XXVIII, № 5(154) М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2014. С. 11 -14.
7. **Дерунец А. С.**, Грошева В. Д., Белодед А. В., Гордиенко М. Г. Влияние оксидативного стресса на физиолого-биохимические особенности молочнокислых бактерий // Успехи в химии и химической технологии: сб. научных трудов. Том XXIX, № 8 М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2015. С. 79 -81.
8. **Дерунец А. С.**, Шевченко И. А., Белодед А. В., Кузнецов А. Е. Физиолого-биохимические характеристики молочнокислых бактерий при использовании комплексных сред с содержанием различных источников факторов роста // сб. мат. Российско-Швейцарского семинара (РХТУ им. Д. И. Менделеева, 26-27 мая 2016 года) / под ред. Меньшутиной Н. В. М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2016. С. 50 – 51.
9. Шевченко И. А., Шустов М. Д., **Дерунец А. С.**, Белодед А. В. Источники азота в составе комплексных сред для микробиологического крупнотоннажного синтеза молочной кислоты // Успехи в химии и химической технологии: сб. научных трудов. Том XXX, № 9(178) М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2016. С. 30 -32.
10. Шустов М. Д., Галеева Ю. С., Шевченко И. А., **Дерунец А. С.**, Белодед А. В. Синтез молочной кислоты клетками *Lactobacillus paracasei*, иммобилизованными в кальций-альгинатном геле // Успехи в химии и химической технологии: сб. научных трудов. Том XXX, № 9(178) М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2016. С. 33 -35.
11. **Дерунец А. С.**, Баранова П. В., Белодед А. В., Кузнецов А. Е. Перекрестный эффект адаптации *Lactobacillus paracasei* к стрессовому воздействию // Сборник выступлений участников программы XII Международного биотехнологического Форума-Выставки РосБиоТех -2018. Москва, 2018. С.148 – 155.

Авторские свидетельства или патенты:

12. Способ культивирования молочнокислых бактерий для получения молочной кислоты // патент РФ № 2712703. / **Дерунец А.С.**, Кузнецов А.Е.