

Дерунец Алиса Сергеевна

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

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: кандидат технических наук, доцент
Александр Евгеньевич Кузнецов

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Список используемых сокращений и условных обозначений.....	10
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1. Молочная кислота и ее применение	11
1.1.1. Основные методы получения молочной кислоты.....	11
1.1.2. Основные сферы применения молочной кислоты.....	12
1.2. Получение молочной кислоты микробиологическим синтезом	13
1.2.1. Продуценты молочной кислоты	13
1.2.2. Молочнокислые бактерии	14
1.2.3. Микроорганизмы, не относящиеся к молочнокислым.....	15
1.3. Особенности биосинтеза МК и регуляции метаболизма у МКБ	19
1.4. Традиционные методы биосинтеза МК, ее очистки и выделения	20
1.5. Получение молочной кислоты при помощи иммобилизованных клеток.....	27
1.6. Непрерывное культивирование и использование мембранного биореактора для получения молочной кислоты	29
1.7. Требования к условиям культивирования. Питательные среды.....	33
1.7.1. Углеродные субстраты.....	34
1.7.2. Азотсодержащие субстраты и ростовые факторы.....	34
1.7.3. Альтернативные источники органического углерода, азота и факторов роста.....	35
1.7.4. Оптимизация состава питательных сред.....	37
1.8. Стресс и стрессовое воздействие на микроорганизмы	39
1.8.1. Изменчивость свойств молочнокислых бактерий	43
1.8.2. Оксидативный стресс у лактобацилл.....	44
1.8.3. Тепловой шок	53
1.8.4. Осмотический стресс	58
1.8.5. Перекрестное стрессовое воздействие	61
1.8.6. Управляемый стресс и его практическое использование применительно к молочнокислым бактериям.....	68
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.	72
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	72
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	79
3.1. Выбор оптимальных параметров состава питательной среды.....	79
3.1.1. Исследование влияния источника углерода на биосинтетическую активность выбранного штамма МКБ.....	79
3.1.2. Культивирование с предобработанной мелассой	85
3.1.3. Подбор источника азота и факторов роста для получения молочной кислоты при культивировании <i>L. paracasei</i>	87
3.1.4. Оптимизация количества компонентов питательной среды с использованием полного факторного эксперимента.....	93

3.2. Исследование контролируемого стрессового воздействия для улучшения показателей биосинтеза молочной кислоты	99
3.2.1. Определение сублетальной концентрации пероксида водорода	99
3.2.2. Отбор устойчивых к пероксиду водорода культур.....	101
3.2.3. Культивирование контрольных и стрессированных линий в ферментере	110
3.2.4. Определение скорости потери устойчивости к оксидативному стрессу (деадаптация)	123
3.2.5. Исследование температурного воздействия на МКБ.....	129
3.2.6. Изучение влияния осмотического стресса на культуру молочнокислых бактерий <i>Lactobacillus paracasei</i>	136
3.2.7. Культивирование молочнокислых бактерий <i>L. paracasei</i> в условиях кислотного стресса	144
3.2.8. Исследование внутриклеточного пула белков стрессированной и нестрессированной культур МКБ.	147
4. ВЫВОДЫ	151
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	153

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

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, которые содержат аминокислоты, витамины и другие факторы роста, источником которых служат разнообразные растительные, животные, дрожжевые гидролизаты и экстракты. Как правило, используется дрожжевой экстракт, вносящий существенный вклад в себестоимость молочной кислоты. Кроме того, недостатками традиционного способа биосинтеза молочной кислоты (простого периодического культивирования) является низкая продуктивность процесса брожения, а также образование в процессе нейтрализации и выделения 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 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.

Также 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, 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.

Таким образом, в основе дальнейшего совершенствования процесса микробиологического синтеза молочной кислоты могут лежать:

- традиционные подходы, в частности оптимизация условий культивирования;
- разработка методов повышения устойчивости популяции продуцента к стрессовому воздействию и рационального управления стрессом.

Цель и задачи исследования.

Целью исследования являлась разработка биологических основ для совершенствования микробиологического синтеза молочной кислоты применительно к высокоинтенсивным методам культивирования, с использованием относительно дешевых питательных сред и 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 отобраным 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, pH).
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 подходящих 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 pH, 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.

Для молочнокислых бактерий 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.

Показано, что 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.

Показана возможность использования соевых гидролизатов в качестве альтернативы дрожжевому экстракту для получения молочной кислоты с использованием бактерий *Lactobacillus paracasei*, найдены оптимальные значения концентраций компонентов питания для выбранных условий культивирования. При использовании вместо дрожжевого экстракта соевых источников ростовых факторов остаточное содержание компонентов питания ниже. Последнее важно для снижения себестоимости молочной кислоты, очистки молочной кислоты, снижения ее потерь и повышения выхода получаемых из нее продуктов, в частности, полилактида.

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

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.

Публикации.

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

Соответствие паспорту научной специальности.

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

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.

Список используемых сокращений и условных обозначений

Сокращения:

АФК – активные формы кислорода

БТШ или **HSP** – белки теплового шока

ВЭЖХ (HPLC) – высокоэффективная жидкостная хроматография

КОЕ – колонии образующие единицы

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

МБР – мембранный биореактор

МКБ – молочнокислые бактерии

МК – молочная кислота

НСД - нуклеотид-связывающий домен

ОС – оксидативный стресс

ОФ-ВЭЖХ – обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

СВ – сухой вес

PLA (ПЛА) - полилактид

СОД – супероксиддисмутаза

ССД - субстрат-связывающий домен

ЭДТА –этилендиаминтетрауксусная кислота

УК – уксусная кислота

HCD - способы культивирования с использованием высоких плотностей клеток (high cell densities)

MRS - среда для культивирования молочнокислых бактерий

SSF - одновременное проведение процессов осахаривания сложного субстрата и культивирования микроорганизмов (simultaneous saccharification and fermentation)

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Молочная кислота и ее применение

1.1.1. Основные методы получения молочной кислоты

Молочная (2-гидрокси-пропановая) кислота (МК) является α -гидроксилированной карбоновой кислотой. Существует в двух диастереоизомерических формах: L(+) - и D(-) -молочная кислота.

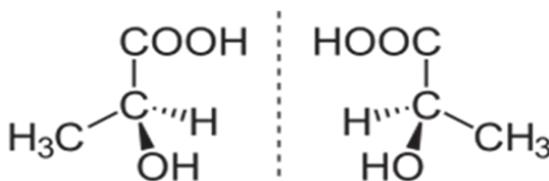


Рис. 1. Энантиомеры молочной кислоты.

Синтетический способ получения МК представляет собой органический синтез на основе различных предшественников (ацетальдегид, уксусная кислота, ацетонитрил и др.), однако, по причине образования рацемических смесей изомеров, синтетический путь не нашел широкого применения в промышленности.

В настоящее время МК получают при помощи микробиологического синтеза. Эффективность процесса биосинтеза МК главным образом зависит от микроорганизма-продуцента МК, стоимости субстрата и режимов культивирования. Микроорганизмы могут синтезировать одновременно как оба стереоизомера, так и каждый из них по отдельности. Синтез зависит от наличия соответствующих лактатдегидрогеназ.

Традиционно для получения МК используется периодический способ культивирования. Периодическое культивирование является самым простым и легко организуемым процессом, так как источник углерода и другие компоненты питательной среды не добавляются в ходе процесса, а загружаются в ферментер перед его непосредственным началом. Исключение составляет только нейтрализующий агент, используемый для поддержания постоянного значения pH. Такой способ имеет определенные преимущества, такие как низкая возможность контаминации и достаточно высокие концентрации конечного продукта (МК) в сравнении с другими методами культивирования [1]. С другой стороны,

периодическое культивирование характеризуется низкими концентрациями биомассы, а также низкой продуктивностью из-за возможного ингибирования процесса субстратом и /или конечным продуктом.

Для решения этих проблем обычно используют другие способы культивирования, такие как: культивирование с подпитками, культивирование с рециклом по биомассе и непрерывное культивирование. Тем не менее, каждый из этих методов имеет некоторые ограничения, и на дальнейшее их развитие для достижения эффективного производства МК направляются большие усилия. Способы культивирования с использованием высоких плотностей клеток (HCDs) с помощью иммобилизации клеток или организации процесса с рециклом по биомассе позволяют достичь высокой производительности по молочной кислоте. Кроме того, последние достижения в области интегрированных мембранных систем создают основу для дальнейшего совершенствования биотехнологического производства МК [2].

1.1.2. Основные сферы применения молочной кислоты

В силу уникального присутствия как гидроксильной, так и карбоксильной групп, МК может участвовать в самых разнообразных химических реакциях, таких как этерификация, конденсационная полимеризация, гидратация (восстановление) и замещение, и это обеспечивает ее огромный потенциал при использовании в качестве предшественника для целого ряда промышленных продуктов и изготовления потребительских товаров. Биоразлагаемые термопласты (полимолочная кислота), «зеленые растворители» (этил-, пропил-, бутилацетаты) и окисленные химические вещества (пропиленгликоль) - всего несколько примеров продуктов, получаемых из МК, рыночный спрос на которые растет в геометрической прогрессии в течение последних лет [3]. Использование МК во многих отраслях промышленности зависит, в первую очередь, от стоимости МК различной степени чистоты.

Наиболее быстро развивающимся направлением на сегодняшний день является использование МК, наряду с другими оксикислотами: гликолевой, оксимасляной, оксивалериановой и оксикапроновой, для создания полимеров.

Полилактид (полимер на основе молочной кислоты, известный как ПЛА (PLA)), является на данный момент одним из самых перспективных биопластиков для создания полимерной упаковки, поскольку полностью разлагается обычной почвенной микрофлорой в течении довольно непродолжительного времени [3].

До массового применения молочной кислоты для производства биоразлагаемых полимерных материалов она широко использовалась и используется в промышленности в качестве растворителя для очистки металлов, в качестве моющих средств, увлажнителя, как вспомогательное средство для крашения и печати в легкой промышленности. Кроме того, молочная кислота и ее соли используются в качестве консервирующих добавок и регуляторов кислотности в пищевой промышленности (Е 270, Е 325, Е 326, Е 327). Молочная кислота в низких концентрациях используется также для производства косметических и фармацевтических препаратов – достижение и поддержание кислотного значения рН. В вышеперечисленных сферах использования необходимый для мировой промышленности объем микробиологически синтезированной молочной кислоты оценивается на данный момент в 250 000 т/год.

В настоящее время 85% от выпускаемого объема молочной кислоты потребляется пищевыми отраслями промышленности, в то время как остальное количество используется для непродовольственных, таких как: производство биополимеров, растворителей и т.д. [3].

1.2. Получение молочной кислоты микробиологическим синтезом

1.2.1. Продуценты молочной кислоты

Продуцентами МК являются микроорганизмы различных таксономических групп - бактерии, грибы, дрожжи, водоросли и цианобактерии [2], а также смешанные культуры [4, 5, 6] и генетически модифицированные микроорганизмы [7].

Выбор штамма играет важную роль, особенно с точки зрения получения молочной кислоты высокой оптической чистоты и высокой продуктивности. На развитие технологий получения молочной кислоты при помощи

микробиологического синтеза влияют различные экономические и экологические аспекты. В зависимости от этого технологии могут отличаться:

1. Видом и штаммами микроорганизмов, осуществляющих брожение;
2. Условиями культивирования продуцентов, аппаратурным оформлением и технологическими решениями при осуществлении стадии биосинтеза.
3. Аппаратурным оформлением и технологическими решениями при выделении и очистке молочной кислоты.

1.2.2. Молочнокислые бактерии

Молочнокислыми бактериями (МКБ) принято называть микроорганизмы, которые способны сбраживать углеродсодержащие субстраты с образованием молочной кислоты. Их объединяют в сем. *Lactobacillaceae*. Все относящиеся к этому семейству бактерии являются грамположительными, не образуют спор за редким исключением и в подавляющем большинстве неподвижны. Кроме того, почти все молочнокислые бактерии не являются строгими анаэробами, а характеризуются аэротолерантностью.

В соответствии с [8] сем. *Lactobacillaceae* включает следующих представителей: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* и *Weisella*. Из всех этих родов микроорганизмов р. *Lactobacillus* является наиболее значимым, включает около 80 видов, которые производят молочную кислоту [8]. Наиболее известные виды лактобацилл: *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus maltoformicus* и *Lactobacillus salivarius*. Такие виды как *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus jensenii*, и *Lactobacillus acidophilus* производят одновременно D-молочную кислоту и смесь двух стереоизомеров [8].

Коммерческую ценность представляют те штаммы, которые выдерживают высокие концентрации молочной кислоты при сохранении продуктивности, и которых возможно подвергать генно-инженерным модификациям для селективного получения D-или L-молочной кислоты [2]. Представители сем. *Lactobacillaceae* используются в пищевой промышленности и не относятся к

патогенным или условно патогенным, не содержат гемопротеинов и активной дыхательной цепи переноса электронов, но несмотря на это, могут расти и в присутствии кислорода воздуха, потому как будучи анаэробами, они все же аэротолерантны. Однако некоторые МКБ, например, представители родов *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei* содержат гены, кодирующие синтез ферментов аэробного дыхания, и способны переходить к аэробному дыханию при добавлении гем-содержащих компонентов в питательную среду [9, 10, 11]. При отсутствии каталаз защиту от образующихся в аэробных условиях активных форм кислорода обеспечивают пероксидазы, NADH:H₂O₂ оксидаза, Mn-содержащая псевдокаталаза [12].

Оптимальные условия культивирования различаются в зависимости от вида МКБ. Большая их часть является мезофилами (рН 5,5 – 6,5, температура 30–40°C). Однако существуют и психрофилы (рост при температуре 3°C), и термофилы, способные расти при 45-62°C [13].

Недостатками проведения промышленных ферментационных процессов с использованием МКБ являются: а) требовательность к наличию в питательной среде факторов роста; б) неспособность расти на простых синтетических средах; в) максимальная активность достигается только в очень узком диапазоне значений рН (от 5,5 до 6,5); г) в ходе ферментации необходимо нейтрализовывать образующуюся молочную кислоту, т.к. она ингибирует рост и биосинтетическую активность МКБ. Обычно для этого используются CaCO₃, Ca(OH)₂, NH₄OH, NaOH, и это приводит к получению соответствующей соли молочной кислоты. Все вышеперечисленные обстоятельства повышают затраты на ферментацию и выделение МК.

1.2.3. Микроорганизмы, не относящиеся к молочнокислым

Существует ряд микроорганизмов, не относящихся к сем. *Lactobacillaceae*, которые также являются продуцентами молочной кислоты. Среди них грибные культуры р. *Rhizopus*. Штаммы р. *Rhizopus* имеют много преимуществ, в том числе из-за их амилолитической активности, что позволяет им использовать различные крахмалистые субстраты без предварительного осахаривания [14], низкая

потребность в питательных веществах [15, 16, 17], низкая стоимость процессов выделения и очистки продукта благодаря своей способности образовывать нитчатые скопления или гранулы и более легкое удаление клеточной массы, по сравнению с дрожжами и бактериями, из культуральной жидкости по окончании ферментации [18]. Кроме того, грибная биомасса является ценным побочным продуктом процесса.

Производство молочной кислоты штаммами *p. Rhizopus* с использованием различных возобновляемых субстратов, в том числе мелассы, сырого крахмала и лигноцеллюлозы описывается во многих статьях [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25].

Тем не менее, существуют факторы, ограничивающие получение молочной кислоты штаммами *p. Rhizopus*: образование в процессе ферментации нежелательных побочных продуктов, в частности этанола и фумаровой кислоты [26, 27], необходимость аэрации среды со скоростью подачи кислорода более чем 0,3 г O₂/л/ч [28, 29], и образование неизбежного для грибов мицелия, который создает определенные проблемы в обеспечении массопереноса, а также при выделении молочной кислоты.

Отдельного внимания заслуживают микроорганизмы, относящиеся к *p. Bacillus*, такие как *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus sp.* [30-40]. По сравнению с молочнокислыми бактериями бактерии *p. Bacillus* обладают некоторыми преимуществами, например, они могут расти на простых средах, включающих лишь некоторые минеральные соли и один источник азота, что позволяет снизить себестоимость получаемой с их помощью молочной кислоты, в то время как синтез молочной кислоты при помощи молочнокислых бактерий подразумевает использование сложных и дорогих питательных сред [30].

Алкалифильные *Bacillus sp.* WL-S20 накапливают L-молочную кислоту в концентрации до 225 г/л при выходе 0,993 г/г в ходе отъемно-доливного культивирования, рН при этом составляет 9,0, что позволяет снизить риск контаминации в ходе культивирования [31].

Существуют термофильные *Bacillus spp.*, которые также могут производить молочную кислоту. Температура культивирования составляет ≥ 50 °С. Это обстоятельство делает *Bacillus spp.* более перспективными по сравнению с другими бактериями. Во-первых, сокращаются расходы охлаждающей воды, используемой при ферментации. Во-вторых, использование *Bacillus spp.* делает возможным одновременное ведение процесса культивирования и процесса осахаривания лингоцеллюлозы целлюлазами при оптимальной температуре [36, 37, 38], а также проведение ферментации с использованием питательной среды без предварительной стерилизации при температурах выше 40 °С [35, 36]. Сообщается, что таким образом можно культивировать термофильные *Bacillus spp.*, например, такие как *B. coagulans* [34, 35, 36, 37, 38, 39], *B. licheniformis* [40], *B. coagulans* 36D1 и *Bacillus sp.* 2-6 [39, 40].

Помимо бациллярных штаммов для производства молочной кислоты также используются генно-инженерные штаммы *E. coli*. При культивировании дикого типа *E. coli* получается смесь этанола и органических (молочной, уксусной, янтарной и муравьиной) кислот [41, 42, 43]. Для увеличения выхода молочной кислоты дикие типы штаммов *E. coli* подвергают генно-инженерным манипуляциям [43, 44, 45, 46].

Штаммы *E. coli* достаточно быстро сбраживают как гексозы, так и пентозы и требуют лишь простейших источников азота.

Сообщается о получении молочной кислоты с использованием генно-инженерных штаммов *E. coli* из глюкозы [43, 44, 47, 48, 49], ксилозы [47] сахарозы [50, 51] и глицерина [52]. Однако продуктивность ($\leq 1,04$ г/л/ч), конечная концентрация ($\leq 62,5$ г/л) и устойчивость к негативному влиянию молочной кислоты у таких штаммов *E. coli* намного меньше по сравнению с многими молочнокислыми бактериями [48, 49, 53].

В качестве продуцента молочной кислоты также используют *Corynebacterium glutamicum*, которые являются грамположительными, аэробными, неспорообразующими и неподвижными сапрофитными бактериями. Сообщается, что они продуцируют некоторые органические кислоты в малых количествах в

условиях лимитирования по кислороду [54]. Некоторые генно-инженерные штаммы *C. glutamicum* продуцируют смесь органических кислот (молочной, янтарной и уксусной) в анаэробных условиях из различных сахаров, таких как L-арабиноза и D-глюкоза [55], D-ксилоза и D-глюкоза [56], D-глюкоза, D-ксилоза, D-целлобиоза [57] и L-арабиноза [58]. Путем выключения гена L-ЛДГ и гетерологичной экспрессии гена, кодирующего D-ЛДГ с *Lactobacillus bulgaricus*, генно-инженерный *C. glutamicum* продуцирует 17,9 г/л D-молочной кислоты (оптическая чистота >99,9%) на 16-й час культивирования, что на 32,3 % больше, чем у дикого (родительского) штамма [59]. Использование коринебактерий в анаэробных условиях при ведении высокоплотного культивирования является предпочтительным, так как энергия прежде всего расходуется на продукцию молочной кислоты, а не на накопление биомассы [60].

В [61] описывается прямая зависимость между концентрацией биомассы и скоростью образования молочной кислоты при высоких плотностях клеток. Продуктивность такого процесса оценивается как 42,9 г/л/ч при концентрации биомассы 60 г/л (СВ) при использовании минеральной среды. Длительность культивирования составляла более 360 часов. Аналогичным образом, при проведении высокоплотного культивирования на такой же среде с глюкозой получали до 120 г/л D-молочной кислоты (оптическая чистота $\geq 99.9\%$) в течение 30 часов с помощью генно-инженерного *C. glutamicum* Δ ldhA/pCRB204 путем экспрессии генов, кодирующих D-LDH, полученных из *Lactobacillus delbrueckii* [61].

Таким образом, *C. glutamicum* являются микроорганизмами, которые могут продуцировать молочную кислоту в высоких концентрациях без необходимости использования сложных питательных сред. С другой стороны, пониженный выход молочной кислоты из-за сопутствующего образования уксусной и янтарной кислот является проблемой, которую также необходимо решать.

Недавно [62] удалось получить генно-инженерный штамм *C. glutamicum*, который может производить из глюкозы лактат в составе его сополимера – поли(3-гидроксибутиратлактата), доля лактата в котором достигает 96,8 мол.%, через несколько последовательных ферментативных реакций, которые представляют

собой получение D-лактил-СоА с помощью D-ЛДГ и пропионил-СоА трансферазы, а также получение 3-гидроксибутирил-СоА, катализируемого β -кетолазой и NADPH-зависимой ацетоацетил-СоА-редуктазой, и сополимеризации D-ацетил-СоА и 3-гидроксибутирил-КоА, что катализируется лактатполимеризующим ферментом. Функциональная экспрессия генов, кодирующих эти ферменты, приводит к образованию поли(3-гидроксибутиратлактата) с высокой долей лактата.

Значительным преимуществом подхода на основе рекомбинантных продуцентов является возможность использования штаммов-продуцентов с относительной кислотоустойчивостью и заранее известными потребностями в факторах роста, синтезирующих требуемый оптический изомер молочной кислоты (L или D) или рацемат.

Вместе с тем следует отметить главные недостатки подходов с использованием рекомбинантных бактерий, дрожжей и грибов: низкую продуктивность биореакторов, неполную конверсию субстрата, а также образование побочных продуктов (этанола, органических кислот, CO_2), особенно в аэробных условиях, что снижает эффективность биосинтеза МК. Кроме того, такие штаммы требуют специфических условий поддержания и, как правило, наличия в среде селективного фактора, предотвращающего потерю генетической конструкции, например, антибиотика. Использование таких продуцентов целесообразно лишь при наличии дешевых и трудно утилизируемых молочнокислыми бактериями субстратов, например, отходов пищевой промышленности и сельского хозяйства.

1.3. Особенности биосинтеза МК и регуляции метаболизма у МКБ

Молочнокислые бактерии подразделяются на две большие группы: гомоферментативные и гетероферментативные. Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически одну молочную кислоту, составляющую не менее 90% всех продуктов брожения. От стереоспецифичности лактатдегидрогеназы и от наличия лактатрацемазы зависит, какой продукт будет образовываться - D(-), L(+) - формы или рацемат. Гомоферментативные

молочнокислые бактерии представляют наибольший интерес для производства молочной кислоты в промышленных масштабах [63].

Гетероферментативные молочнокислые бактерии, в отличие от гомоферментативных, сбраживающих сахара по гликолитическому пути, осуществляют сбраживание сахаров по пентозофосфатному пути, в ходе которого шестиуглеродные сахара (гексозы) переходят в пятиуглеродные (пентозы) при помощи фосфокетолазы. Конечными продуктами этого процесса являются глицеральдегид 3-фосфат и ацетилфосфат. В ходе дальнейших превращений глицеральдегид 3-фосфат превращается в лактат, а ацетилфосфат – в этанол и уксусную кислоту.

Большинство гетероферментативных молочнокислых бактерий превращают пентозы в молочную кислоту и сопутствующие продукты через фосфокетолазный путь с максимальным выходом 0,6 г молочной кислоты на 1 г пентоз. Недавно стало известно, что *Enterococcus mundtii* QU 25 [64] и генно-инженерный *Lactobacillus plantarum* [65, 66] осуществляют гомоферментативное молочнокислое брожения, преобразуя пентозы в молочную кислоту.

К облигатным гетероферментативным молочнокислым бактериям относятся *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. reuteri*, *L. viridescens* [12], а также бактерии р. *Leuconostoc*, бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum*.

Следует заметить, что подразделение МКБ на гомоферментативные и гетероферментативные не носит абсолютного характера. Многие гомоферментативные МКБ способны переключаться на гетероферментативный способ сбраживания субстрата при определенных условиях: сбраживании различных сахаров, отличных от глюкозы, пентоз, при стрессовых условиях (высокие рН, неоптимальные температуры) [66].

1.4. Традиционные методы биосинтеза МК, ее очистки и выделения

Периодическое культивирование является традиционным способом получения органических кислот, в частности МК. При *простом периодическом культивировании* в ферментер загружаются компоненты свежей питательной среды и суспензия клеток микроорганизма-продуцента, после чего в течение

установленного времени осуществляют процесс без добавления субстрата и отвода культуральной жидкости, исключение составляет нейтрализующий агент для поддержания постоянного рН. По окончании процесса ферментер освобождается, и цикл культивирования повторяют снова.

Подобный процесс легко организовать как в лабораторных, так и в промышленных условиях [67], однако в настоящее время простое периодическое культивирование на практике используют все реже из-за сравнительно небольшой продуктивности биореактора.

В периодическом режиме культивирования конечная концентрация молочной кислоты возрастает при увеличении начальной концентрации глюкозы вплоть до 200 г/л [68, 69, 70]. В работе [71] сообщается о том, что при использовании штамма *L. paracasei subsp. paracasei* CB2121 конечная концентрация молочной кислоты достигала 192 г/л при начальной концентрации глюкозы 200 г/л.

Несмотря на это, используемые концентрации сахаров в промышленном производстве составляют всего 5-10%, при этом сам процесс длится от 3 до 6 дней. Температура культивирования для разных штаммов молочнокислых бактерий составляет от 30 до 37⁰С [66].

В процессе ферментации рН ферментационной среды контролируют во избежание ингибирования роста МКБ низкими значениями рН вследствие потребления компонентов питания и накопления молочной кислоты, которая в свободной форме сильнее ингибирует продуктивность бактерий. В качестве нейтрализующих реагентов используют гидроксид кальция, гидроксид натрия, аммония или свободный аммиак, переводящих свободную молочную кислоту в лактат. Лактат в дальнейшем, в ходе выделения, может быть переведен в молочную кислоту в результате реакции с сильными кислотами (серной, соляной).

Использование аммиака для нейтрализации ферментационной среды является более предпочтительным по сравнению с другими основаниями [72], потому что он может являться дополнительным источником азота для бактерий. Это подтверждается тем, что при его использовании наблюдается лучший рост по сравнению с гидроксидом натрия. Однако в традиционном процессе, как правило,

используют гидроксид кальция для контроля pH среды, в том числе в процессе промышленного производства, используемым, например, фирмой Nature Works [27]. Чтобы перевести лактат в молочную кислоту к нативному раствору добавляют серную кислоту, что сопровождается образованием осадка гипса ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Гипс отделяется от нативного раствора фильтрацией и представляет собой побочный продукт, который может быть использован в качестве строительного материала. По различным оценкам на каждую тонну молочной кислоты приходится до 1 тонны гипса [73].

Далее нативный раствор молочной кислоты подвергается тщательной дополнительной очистке для получения чистой молочной кислоты. Используются различные технологии, включая электродиализ, обратный осмос, жидкостную экстракцию, ионообменные методы, дистилляцию, образование нерастворимых солей, этерификацию. Несмотря на то, что нет принципиальной разницы в технологиях очистки D-молочной кислоты и L-молочной кислоты, как правило, избегают экстремальных условий (например, высоких температур) в связи с высокой вероятностью рацемизации D-молочной кислоты в L-молочную кислоту и наоборот.

Для интенсификации процесса используются: *культивирование с подпиткой субстратом, и полунепрерывные методы: отъемно-доливное культивирование, культивирование с рециклом по биомассе, а также непрерывное культивирование.*

Культивирование с подпиткой субстратом применяется во избежание ингибирования роста и биосинтеза высокими концентрациями субстрата, превышающими критические и приводящие к увеличению лаг-фазы, снижению скорости брожения и утилизации сахаров и лизису клеток. Процесс ферментации организуется таким образом, что субстрат подается в ферментер по мере его потребления микроорганизмами – такой подход исключает ингибирование субстратом. С этой точки зрения культивирование с подпиткой является лучшим по сравнению с обычным периодическим и непрерывным способами [74]. Для увеличения концентрации продукта при использовании такого способа важно

учитывать время и частоту внесения подпитки, поддерживать концентрацию субстрата в ферментационной среде, а также методы внесения субстрата.

В последнее время было разработано несколько инновационных способов культивирования с подпиткой с целью получения молочной кислоты [75, 76, 77, 78]. Подпитки могут вноситься в экспоненциальной фазе, фазе замедленного роста, стационарной фазе. Все эти методы просты в исполнении и не требуют серьезного аппаратного оформления, позволяя при этом добиваться высокой производительности биореактора.

В работе [79] использовалось несколько способов внесения подпитки с целью получения L- молочной кислоты штаммом-продуцентом *L. casei* LA-04-1. Концентрация глюкозы в подпиточном растворе составляла 890 г/л (разбавлялся при внесении), дрожжевого экстракта – 1%, достигаемая концентрация молочной кислоты при этом – 180 г/л, продуктивность процесса – 2,14 г/(л*ч), что на 56,5% и 59,7%, соответственно, выше, чем при проведении обычного периодического культивирования.

Возможно получать до 210 г/л молочной кислоты с выходом 0,97 г/г и продуктивностью 2,2 г/(л*ч) при постоянной подаче глюкозы в ферментер [80]. Сообщается также, что был разработан способ рН-статируемого культивирования штамма *L. lactis* ВМЕ5-18 в режиме с подпиткой [80, 81].

Следует отметить, что процесс при постоянном контролируемом остаточном содержании глюкозы является более эффективным, если поддерживать физиологическую активность молочнокислых бактерий на должном уровне, что отмечено в работе [82]. В этом случае концентрация глюкозы в подпиточном растворе составляла 770 г/л, а для контроля ее остаточного содержания в ферментационном растворе был разработан особо чувствительный датчик на глюкозу; рН поддерживался на уровне 6,25 с помощью NH₄OH. Достигаемая при этом концентрация L-молочной кислоты составляла 170 г/л при продуктивности 2,6 г/(л*ч). Штамм-продуцент - *L. rhamnosus* LA-04-1.

Хотя культивирование с подпиткой субстратом является более предпочтительным по сравнению с периодическим и позволяет достигать высоких

концентраций молочной кислоты – до 226 г/л [80] - производительность биореактора по-прежнему остается достаточно низкой. В связи с этим необходимо разрабатывать другие методы, которые обеспечивают более высокую продуктивность биореактора.

Отъемно-доливное культивирование отличается от периодического тем, что после окончания процесса из ферментера удаляется лишь часть культуральной жидкости (биомасса остается в биореакторе), вместо которой доливается свежая питательная среда равного объема.

Существуют примеры проведения процесса в отъемно-доливном режиме с одновременным осахариванием сложного субстрата и культивированием микроорганизмов (SSF) [83]. В таком режиме достигалось [84] накопление 37,8 г молочной кислоты на 100 г целлюлозной биомассы при продуктивности 0,87 г/(л*ч) с использованием целлюлазы и β -глюкозидазы в SSF-процессе. Штамм-продуцент – *L. rhamnosus* CECT-288.

В работе [85] сообщается о высокоэффективном производстве D-молочной кислоты из гидролизатов арахисовой муки и глюкозы с использованием SSF отъемно-доливного процесса, в результате чего образовалось 207 г/л (отъем-долив осуществлялся один раз) и 226 г/л (отъем-долив осуществлялся неоднократно) D-молочной кислоты, соответственно. При организации процесса аналогичным образом [86] из целлюлозы получали L-молочную кислоту, концентрация которой достигала 80 г/л. Штамм-продуцент – *B. coagulans* 36D1.

В ходе SSF отъемно-доливного процесса с использованием смешанной культуры *Aspergillus niger* SL-09 и *Lactobacillus sp.* G-02 как продуцентов гидролитических ферментов (инулиназы и инвертазы) и молочной кислоты, соответственно, получали 120,5 г/л L-молочной кислоты из клубней топинамбура с выходом L-молочной кислоты в 0,945 г/г общих сахаров в течение 36 часов культивирования [87].

Хотя отъемно-доливной способ культивирования обеспечивает более высокую скорость биосинтеза по сравнению с периодическим и позволяет достигать высоких концентраций молочной кислоты, продуктивность

биореакторов по-прежнему остается относительно низкой. В связи с этим необходимо разрабатывать другие методы, которые обеспечивают более высокие показатели биосинтеза.

Культивирование с рециклом по биомассе заключается в проведении процесса с возвратом части биомассы, полученной в конце ферментации. Для организации рецикла используют различные методы, например, центрифугирование или использование половолоконного модуля для бактериальных культур, фильтрацию или осаждение мицеллиальных гранул для грибов. По сравнению с обычным периодическим и полупериодическим культивированием, культивирование с рециклом имеет ряд преимуществ: увеличение выхода целевого продукта, обеспечение высокой концентрации клеток микроорганизма-продуцента, высокую продуктивность биореактора, сокращение трудовых и временных затрат на стерилизацию ферментера и на подготовку посевного материала. Культивирование с рециклом по биомассе может быть организовано как с использованием одного биореактора, так и нескольких одновременно («батарея» или каскад биореакторов). Обычно культивирование с использованием одного биореактора применяется, когда необходимо получить биомассу или целевой продукт, кинетика накопления которого совпадает с кинетикой накопления биомассы. Использование многоступенчатых систем («батарей» или каскадов биореакторов) целесообразно, когда получают вторичные продукты биосинтеза, кинетика накопления которых отстает от кинетики накопления биомассы.

В работе [88] сообщается о максимальной концентрации полученной молочной кислоты равной 107 г/л с оптической чистотой 99,8% при использовании термофильного штамма *Bacillus sp.* 2-6 путем проведения «открытой» (нестерильной) периодической ферментации с рециклом. Сообщалось [89] об улучшении продуктивности биореактора по молочной кислоте (6,34 г/(л*ч)) при периодическом культивировании с рециклом биомассы с использованием сырной сыворотки при помощи *Lactobacillus sp.* RKY2, что было в 6,2 раза выше, чем полученная при проведении простого периодического культивирования (без рецикла). Сообщается [90], что подобным образом можно увеличить

продуктивность биореактора по молочной кислоте до 4 г/(л*ч), используя гидролизат древесины и жидкий кукурузный экстракт при проведении периодического культивирования *Enterococcus faecalis* RKY1 с рециклом. Это в 2,7 раза выше, чем при традиционном периодическом культивировании.

Также известно [91], что при использовании относительно небольших мицеллиальных гранул *R. oryzae* NRRL395 на протяжении 9 циклов свыше 14 дней достигалась достаточно высокая продуктивность вплоть до 2,02 г/(л*ч), что было в 1,9 раз выше, чем при простом периодическом культивировании. Источником углерода служил кукурузный крахмал, использовался реактор аэрлифтного типа. Также показано, что можно использовать две различные физиологические формы (нитчатую и гранулярную) для получения L-молочной кислоты при помощи *R. oryzae* ATCC 52311 в ходе периодического культивирования с рециклом, причем продуктивность биореактора при этом достигает 5,06 и 4,39 г/(л*ч) соответственно [92].

В статье [93] сообщается о достижении продуктивности биореактора по молочной кислоте 3,51 г/(л*ч) при проведении культивирования с рециклом по биомассе, используя *R. oryzae* R1021, а с использованием флоккул *R. oryzae* – продуктивности и выхода молочной кислоты соответственно 4,03 г/(л*ч) и 0,90 г/г субстрата при проведении 6 циклов ферментации с рециклом по биомассе [94]. В аналогичных исследованиях с использованием гранул *R. oryzae* AS 3.819 при проведении культивирования с рециклом по биомассе в 7-ми литровом ферментере с мешалкой была достигнута концентрация молочной кислоты и продуктивность биореактора соответственно 103,7 г/л и 2,16 г/(л*ч) для первого цикла; в последующих 19 повторяющихся циклах конечная концентрация молочной кислоты снижалась до 81-95 г/л, а продуктивность повысилась до 3,3 – 3,85 г/(л*ч) [96].

Возможно также организовать достаточно необычный процесс, при котором возможно совместно получать молочную кислоту и хитин при помощи гранулированного *R. oryzae* NRRL 395, концентрация молочной кислоты составляет при этом 66 г/л, продуктивность - 2,4 г/(л*ч) [95].

1.5. Получение молочной кислоты при помощи иммобилизованных клеток

Методы иммобилизации клеток на носителе стали одним из наиболее полезных путей повышения концентрации клеток в ферментационной среде и производительности биореакторов. Кроме того, иммобилизация клеток позволяет организовать культивирование по непрерывному варианту, улучшает стабильность работы биореактора, снижает потребность в источниках ростовых факторов, позволяет проводить культивирование несколько раз с повторным использованием иммобилизованных клеток, упрощает процесс выделения и очистки молочной кислоты и уменьшает риск контаминации из-за высокой концентрации используемых клеток [97, 98]. Биореакторы с иммобилизацией могут работать при высоких скоростях разбавления, поскольку иммобилизация препятствует вымыванию клеток из ферментера. Однако их возможности ограничены скоростью массопереноса [99].

Существует 4 группы методов иммобилизации: адсорбция, гранулирование, инкапсулирование и самоагрегация (образование агрегатов) [100, 101] (рис. 2).

Адсорбция на твердых поверхностях носителей является наиболее распространенным методом, потому что ее легко осуществить. Также данный процесс оказывает лишь небольшое влияние на форму и структуру клеток, которые удерживаются на поверхности носителей физическими (Ван-дер-Ваальсовыми) или электростатическими силами или путем ковалентного связывания между клеточной поверхностью и носителем [102].

Тем не менее, физические силы достаточно слабы, что является основным ограничением этого метода. Силы ковалентного связывания прочнее, однако предполагают использование различных химических веществ, что оказывает вредное воздействие на клетки и поэтому не являются предпочтительными для обеспечения иммобилизации [103].

Были исследованы разнообразные материалы, используемые в качестве подложки (носителя), в том числе активированный уголь [104], алюминиевые шарики [105], стекло и керамика [106], щепы [107], пластиковые композитные материалы [108] и хлопковые волокна [102].

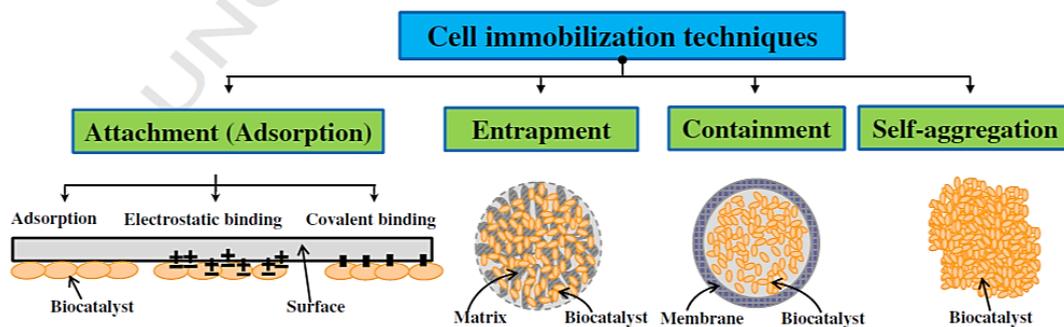


Рис. 2. Способы иммобилизации клеток.

Методы инкапсулирования являются более популярными для иммобилизации клеток из-за простоты использования сферических частиц, содержащих клетки, получаемые путем «прокапывания» полимера через клеточную суспензию. Материалы, обычно используемые для инкапсулирования, – полисахаридные гели, такие как альгинат кальция, агар, агароза, каппа-каррагинан, хитозан, а также полигалактуроновые или другие полимерные матрицы, например, желатин, коллаген, поливиниловый спирт [109, 110, 111]. Во время непрерывной длительной эксплуатации может происходить инактивация клеток. Чтобы избежать этой проблемы, были разработаны двухслойные шарики [112]. Кроме того, недостаточное поступление кислорода к клеткам из-за диффузионного сопротивления значительно снижает продуктивность биореактора, особенно при проведении аэробного культивирования [113]. Также подготовка большого числа капсул, необходимых для проведения промышленных процессов может оказаться трудоемкой и экономически затратной [114].

Механическое гранулирование может быть достигнуто путем использования микропористых мембранных фильтров, захвата клеток в микрокапсулы, или иммобилизации, где в качестве подложки используется поверхность взаимодействия двух несмешивающихся жидкостей [115]. Это уместно, когда необходимо получать соединения, выделяемые микроорганизмами в культуральную жидкость [111]. Однако ограничения массопереноса и возможность биообрастания поверхности гранул (при использовании мелкопористых материалов) являются основными недостатками этого метода [100].

Некоторые микробные клетки могут агрегировать с образованием более крупных единиц, которые образуют сгустки и быстро осаждаются [116].

Агрегирование можно считать методом естественной иммобилизации, что наблюдается, в основном, у грибных культур. Искусственные агенты могут быть использованы для повышения агрегации клеток, которые не могут агрегировать естественным путем [100]. Было показано, что таким способом может быть достигнута высокая производительность биореактора по молочной кислоте [18, 117]. Агрегированные и иммобилизованные клетки *Rhizopus* применялись для проведения процесса в биореакторах различных конструкций, в том числе эрлифтных, биореакторах с обеспечением возвратно-поступательного движения ферментационной среды (непрерывные процессы), биореакторах башенного типа [29, 118, 119, 120, 121].

Тем не менее, в большинстве случаев при иммобилизации клеток *Rhizopus* выход молочной кислоты составляет только 0,65–0,78 г/г субстрата, при концентрации молочной кислоты 40–73 г/л [118, 120, 123, 124]. Хотя есть случаи, когда выход молочной кислоты составляет более 85% [19, 125, 126]. Сложные процессы иммобилизации, истирание подложки и возможность повреждения биореактора на высокой скорости перемешивания ограничивают использование иммобилизации [127]. Тем не менее, сообщается о получении молочной кислоты именно таким способом при проведении обычного периодического культивирования [38, 127, 128], отъемно-доливного культивирования [129], отъемно-доливного SSF процесса [121] и непрерывного культивирования [105, 130, 131] с использованием биореакторов различных конструкций, например, таких как реакторы непрерывного действия с механическим перемешиванием, реакторы с псевдооживленным слоем, реакторы со встроенными слоями носителя для иммобилизации.

1.6. Непрерывное культивирование и использование мембранного биореактора для получения молочной кислоты

Наряду с вышерассмотренными методами с целью получения молочной кислоты проводят непрерывное культивирование, которое является

привлекательным в плане повышения продуктивности биореактора, а также культивирование с отводом молочной кислоты вместе с другими метаболитами из зоны ферментации для предотвращения ингибирования конечным продуктом, что наблюдается в периодическом/отъемно-доливном культивировании [132, 133]. Хемостатное культивирование является классическим способом непрерывного процесса, в котором происходит непрерывная подача свежей среды в ферментер и одновременно отводится культуральная жидкость; скорость подачи и отъема при этом одинакова для обеспечения постоянного объема ферментационной среды. При использовании такого способа культивирования концентрации клеток, образующихся продуктов, а также субстратов в ферментере поддерживается на постоянном уровне во время работы биореактора в одном и том же режиме ферментации. Удельную скорость роста микроорганизмов можно регулировать изменением скорости разбавления [134].

Непрерывный процесс происходит с гораздо меньшим числом остановок, чем периодический (где ферментер должен быть полностью освобожден, вымыт и загружен заново), кроме этого, в непрерывном процессе отсутствует лаг-фаза роста, снижающая продуктивность биореактора [135, 136]. Так, при проведении непрерывного культивирования продуктивность по молочной кислоте увеличивается на 1,56 г/(л*ч) (*Enterococcus faecium* 982 Q 31) [137] и на 4,53 г/(л*ч) (*L. plantarum* SW14) [138] по сравнению с периодическим. В статье [139] сообщается о продуктивности по молочной кислоте равной 3,1 г/(л*ч) при скорости разбавления 0,2 ч⁻¹. Субстратом служил гидролизат побегов виноградной лозы, продуцент - *L. pentosus* СЕСТ-4023 Т.

Также сообщается о повышении продуктивности в случае получения D-молочной кислоты из глюкозы при помощи *L. delbrueckii subsp. lactis* QU 41 – 2,07 - 3,55 г/(л*ч) при проведении непрерывного культивирования по сравнению с периодическим (1,67 г/(л*ч) [140].

Тем не менее, отток неиспользованных источников углерода и клеток из ферментера и уменьшение концентрации молочной кислоты с увеличением скорости разбавления являются недостатками непрерывного процесса [129].

Вышеназванные недостатки можно преодолеть, используя *высокоплотностное культивирование (HCD культивирование)*.

HCD в настоящее время широко используется для некоторых ферментативных процессов. Однако этот термин не имеет четкого определения. Считается, что высокие концентрации клеток, приблизительно в 10 раз большие, чем те, которые обычно достигаются в ходе периодической ферментации, будут обеспечивать HCD процесс [141]. Такой процесс является экономически эффективным для крупномасштабного производства, в основном из-за высокой продуктивности и отсутствия проблем с контаминацией [142]. Кроме того, для HCD могут использоваться более компактные ферментеры. Однако эти системы трудно проектировать и эксплуатировать [143]. Методы, используемые для достижения HCD, весьма различны – это и проведение периодического культивирования, и иммобилизация клеток, и организация процесса с рециклом по биомассе. В статье [127] описывается новый метод достижения HCD – совместное культивирование *L. paracasei subsp. paracasei* с быстрорастущей культурой *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* с использованием полиуретановых кубов, на которых данные микроорганизмы образуют биопленку.

Мембранные системы, обеспечивающие рецикл биомассы, являются другим способом обеспечения высоких плотностей клеток, где для отделения пермеата от клеток и возвращения клеток обратно в биореактор используются различные мембраны, например, полуволоконная ультрафильтрационная мембрана, плоская микрофильтрационная с тангенциальным перекрестным током в полуавтоматическом замкнутом контуре и другие. Эти системы имеют преимущества в плане обеспечения гомогенности среды, полного рецикла биомассы, получения и отделения продукта непосредственно в реакционной смеси. Это также повышает не только скорость конверсии субстрата в среде, но и продуктивность биореактора благодаря намного большей концентрации клеток, чем достигаемая при обычном ферментационном процессе. При помощи этого метода непрерывное культивирование может проводиться с гораздо большей

скоростью разведения – до $2,8 \text{ ч}^{-1}$ без вымывания клеток, достигая высокой продуктивности по молочной кислоте – $160 \text{ г}/(\text{л} \cdot \text{ч})$ [144].

Полимерные мембраны нестойки при высоких температурах, которые требуются для стерилизации, кроме того существуют проблемы «обрастания» (т.е. поры мембран забиваются микроорганизмами) и требования к их очистке, что нивелирует преимущества этих мембран, приводя к увеличению амортизационных издержек. Все это затрудняет их массовое применение в промышленности.

Для преодоления проблем «обрастания» мембранные биореакторы конструируются самыми различными способами. Модификация конструкции биореактора позволяет достичь повышения производительности. Например, чтобы снизить «обрастание» мембраны использовалась автоматическая регулировка подачи ферментационной среды с клетками на мембранную фильтрацию и рециклом клеток в биореактор по сигналу электромагнитного расходомера с включением пневматического мембранного насоса [145]. В результате в ходе непрерывного культивирования продуктивность биореактора составляла $31,5 \text{ г}/(\text{л} \cdot \text{ч})$, а эксплуатационная стабильность – 155,5 часов, по сравнению с достигаемыми при использовании перистальтического или диафрагмового насоса без электромагнитного расходомера (56 и 85 часов соответственно).

В статье [146] описывается применение метода обратной промывки свежей питательной средой для обеспечения стабильной проницаемости погружного полволоконного мембранного модуля. Такой процесс привел к повышению выхода молочной кислоты и более чем в 2 раза повысил продуктивность биореактора по молочной кислоте.

Керамические мембраны имеют преимущество в плане устойчивости к повышенной температуре, к кислотным и щелочным средам, к механическому и абразивному воздействию, простоты очистки по сравнению с полимерными мембранами. Их эксплуатационная стабильность выше, чем полимерных – вплоть до 240 часов при непрерывном культивировании. Так, при использовании выносного модуля с микрофильтрационными керамическими мембранами достигалось увеличение в биореакторе с механическим перемешиванием

концентрации клеток промышленно важных штаммов *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Oenococcus oeni* и *Bifidobacterium longum* и повышение продуктивности биореактора в 10–33 раз по сравнению с реактором непрерывного действия [147].

В статье [144] сообщается о достижении концентрации молочной кислоты в 157,2 г/л в опытной установке (ферментер на 3000 л) с продуктивностью биореактора 8,77 г/(л*ч) при использовании выносной микрофильтрационной керамической мембраны.

В работе [148] был использован 7-ми ступенчатый каскадный реактор с мембранным модулем, что позволило достичь концентрации молочной кислоты 72 г/л при продуктивности 28 г/(л*ч). При использовании двухступенчатого процесса с рециклом по биомассе *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 получали 92 г/л D-молочной кислоты с продуктивностью реактора 57 г/(л*ч) [149]. Таким образом, использование мультистадийной системы непрерывного культивирования и рецикл биомассы позволяют достичь высоких плотностей клеток с концентрацией молочной кислоты, сопоставимой с периодическим и полупериодическим культивированием, но с продуктивностью биореакторов гораздо более высокой.

В целом, с точки зрения современных требований к высокоэффективным ферментационным системам, иммобилизация и организация процесса с рециклом по биомассе являются более предпочтительными по сравнению с классическими системами с периодическим и непрерывным хемотропным культивированием [150].

1.7. Требования к условиям культивирования. Питательные среды

Большинство видов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus* требуют сложных питательных сред для их культивирования, включающих такие вещества, как аминокислоты, пептиды, нуклеотиды, витамины, что значительно увеличивает издержки производства [26, 67].

1.7.1. Углеродные субстраты

Обычно для культивирования молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus* в качестве источника углерода используют углеводы, содержащие редуцирующие вещества, потому что, как правило, молочнокислые бактерии не обладают амилолитической активностью и не способны потреблять полисахариды [151]. Однако, есть отдельные штаммы, которые способны утилизировать дисахариды и даже некоторые олигосахариды [151].

При использовании глюкозы в качестве источника углерода степень конверсии субстрата достаточно велика и составляет обычно 95-98%, однако возможность замены глюкозы на экономически более эффективные источники углерода вызывает все больший интерес. Существуют исследования, показывающие возможность замены глюкозы при культивировании молочнокислых бактерий на различные гидролизаты и экстракты, как растительного, так и животного происхождения [152]. Статья [153] описывает возможность эффективной замены глюкозы на очищенные от токсичных примесей гидролизаты лигноцеллюлозы, причем конечная концентрация молочной кислоты составляла 215 г/л при отъемно-доливном культивировании генно-инженерного штамма *Lactobacillus paracasei* 7 VL, а при использовании в качестве источника углерода нетоксифицированного древесного гидролизата – лишь 99 г/л.

1.7.2. Азотсодержащие субстраты и ростовые факторы

Примерно 17% сухого веса клетки по оценкам элементного состава составляет азот, включенный в состав белковых молекул, нуклеиновых кислот и других соединений. При культивировании для роста микроорганизмов используют различные источники азота и факторы роста, которые могут быть как органического, так и неорганического происхождения.

Среди источников азота неорганического происхождения влияние солей аммония на бактериальные и грибные культуры является наиболее изученным вопросом [151]. Однако использование солей аммония при культивировании молочнокислых бактерий не обеспечивает требуемую динамику роста. Для достижения необходимого эффекта требуется использовать сложные органические

источники азота, такие как дрожжевые гидролизаты [154], мясной бульон и гидролизаты муки [155].

Бактерии рода *Lactobacillus* достигают лучших показателей при культивировании с использованием сред, где в качестве источника азота содержатся дрожжевой экстракт и пептон [156]. Но промышленное получение молочной кислоты на основе такой питательной среды экономически не выгодно, поэтому поиск альтернативных источников азота является актуальной проблемой до сих пор [157].

Также показано, что добавление в среду витаминов группы В приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток на 20 – 24 ч культивирования от $6,5 \times 10^6$ до $1,9 \times 10^9$ КОЕ/мл, способствует гидролизу клетками соевых олигосахаридов и большей ассимиляции редуцирующих сахаров молочнокислыми бактериями *L. acidophilus* ATCC 314 и *L. gasseri* FTDC 8131 [158].

Помимо витаминов значительное влияние на кинетику роста молочных бактерий оказывают ионы Mn^{2+} . Так, статья [159] описывает одновременное проведение процессов осахаривания сложного субстрата и культивирования *Lactobacillus paracasei*. Показано, что при увеличении содержания в питательной среде ионов Mn^{2+} на 15 мМ происходит более активное сбраживание сахаров благодаря интенсификации процессов гликолитического пути, что приводит к увеличению конечной концентрации молочной кислоты на 40%. Однако вместе с тем повышенная концентрация ионов Mn^{2+} оказывает негативное влияние на процесс осахаривания. Ряд статей, посвященных метаболизму бактерий рода *Lactobacillus*, подтверждает тенденцию увеличения концентраций молочной кислоты при повышении концентраций солей марганца [160, 161, 162, 163].

1.7.3. Альтернативные источники органического углерода, азота и факторов роста

Замена дрожжевого экстракта на альтернативные источники азота и факторов роста является сложной задачей, так как он является практически универсальным источником факторов роста для молочнокислых бактерий и содержит витамины

(рибофлавин, тиамин, пантотеновая, никотиновая и фолиевая кислота, биотин) и микроэлементы [151].

В отдельных случаях дрожжевой экстракт заменяют на менее дорогие источники азота. В качестве альтернативы дрожжевому экстракту можно использовать различные гидролизаты. Они применяются либо в составе комплексных сред, либо добавляются в синтетические. Кроме того, по сравнению с дрожжевым экстрактом, использование гидролизатов более экономически выгодно, так как они чаще всего представляют собой отход крупнотоннажных производств. При использовании гидролизатов в качестве одного из основных компонентов питательной среды можно значительно снизить стоимость конечного продукта – молочной кислоты. Вторым положительным моментом является улучшение экологической ситуации.

Сырье, используемое для получения гидролизатов, применяющихся при культивировании микроорганизмов, может быть растительного, животного и микробного происхождения.

Из растительных часто используют гидролизаты свекловичной и соевой мелассы, гороха, кукурузы, растительной массы древесных и зерновых пород. При этом такие высокомолекулярные соединения как целлюлоза, крахмал, лигнин распадаются с образованием олиго-, ди- и моносахаров, представленных как пентозами, так и гексозами. Животные и микробные гидролизаты могут служить источниками низкомолекулярного органического азота при культивировании, так как содержащиеся в них белки гидролизуются по пептидным связям с образованием смеси, состоящей из пептидов и отдельных аминокислот [164].

Использование гидролизатов усложняет процесс накопления биомассы, так как гидролизаты представляют собой смесь пентоз и гексоз, поэтому микроорганизмы должны адаптироваться к смене источника углерода. Это является основной проблемой культивирования с использованием гидролизатов. Однако ряд исследований подтверждает возможность получения положительных результатов при культивировании с использованием гидролизатов [165, 166, 167, 168].

Например, исследовалась возможность применения различных гидролизатов растительных отходов для получения МК [169]. Из четырех видов гидролизатов соломы, сои, пшеницы, кукурузы и риса лучшие значения продуктивности 0,61 г/(л×ч) и выхода продукта (0,8 г/г) были достигнуты при культивировании в течение 42 часов бактерий *Lactobacillus casei* на среде с соевым ферментативным гидролизатом, содержащей 35 г/л редуцирующих сахаров.

В другом исследовании проводилось простое периодическое культивирование и культивирование с внесением подпитки для оценки возможности замены дрожжевого экстракта на гидролизат соевой мелассы, с внесением дополнительного количества кукурузного экстракта. Использовался штамм-продуцент L-молочной кислоты *Lactobacillus casei* LA-04-1. Полученные показатели – концентрация (162,5 г/л), выход (89,7%), продуктивность реактора (1,69 г/(л×ч)) были ниже, чем при проведении аналогичного процесса с использованием в качестве источника азота и ростовых факторов дрожжевого экстракта – 180 г/л, 90,3%, 2,14 г/(л×ч) соответственно [170].

1.7.4. Оптимизация состава питательных сред

Методы оптимизации по-прежнему остаются актуальными для совершенствования процессов культивирования молочнокислых бактерий. В этих целях используются методы статистического планирования эксперимента, методы математического моделирования с описанием динамики процесса, поиском кинетических констант, определения влияния различных факторов.

Стандартные методы, применяющиеся для планирования как активных, так и пассивных экспериментов, включают полный факторный эксперимент, метод дробных реплик, насыщенные планы Плаккета-Бермана, композиционные планы и метод крутого восхождения по поверхности отклика [171, 172]. Чаще всего проводят либо оптимизацию состава питательных сред, либо условий культивирования [173, 174, 175, 176, 177], в том числе с целью повышения выхода молочной кислоты. Так в статье [163] в условиях смешанной ферментации и контролируемого pH был достигнут более высокий выход 96,3% по сравнению с брожением *Lactobacillus rhamnosus* на немодифицированной питательной среде

(68,8%). Титр молочной кислоты, выход и производительность достигали 121 г/л, 94,6% и 2,18 г/(л*ч) соответственно.

Были исследованы процессы получения молочной кислоты при помощи термофильных *Lactobacillus plantarum* с использованием пяти альтернативных источников азота – экстракта солодовых ростков, жидкого кукурузного экстракта, NH_4Cl , NH_4NO_3 , диаминцитрата [178]. Посредством статистического анализа результатов путем построения поверхностей отклика было обнаружено, что экстракт солодовых ростков и жидкий кукурузный экстракт оказывают существенное влияние на продуцирование молочной кислоты, и их оптимальные концентрации в среде должны составлять 16,0 г/л и 12,0 г/л соответственно. Культивирование с использованием оптимизированной среды показало, что максимальная удельная скорость роста (μ_m) составляла 1,09 ч⁽⁻¹⁾, выход биомассы ($Y_{X/S}$) и выход L(+)-молочной кислоты ($Y_{P/S}$) – 0,233 OD₆₂₀/г и 0,98 г/г соответственно, а максимальная продуктивность и средняя продуктивность - 13,0 г/(л*ч) и 3,20 г/(л*ч) соответственно. Результаты показали, что получение молочной кислоты возможно при использовании недорогих альтернативных источников азота.

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что использование в составе питательной среды гидролизатов животного и растительного сырья, являющихся отходами различных производств, вместо традиционных глюкозы и дрожжевого экстракта должно способствовать снижению стоимости питательной среды и себестоимости получаемой молочной кислоты. Поэтому подбор альтернативных источников углерода, азота и факторов роста, а также оптимизация состава питательной среды для культивирования молочнокислых бактерий являются актуальными практическими задачами при получении молочной кислоты.

Другой рациональный подход к совершенствованию биосинтеза молочной кислоты может быть основан на понимании изменений в биосинтезе при различных стрессовых воздействиях на продуцент, которые неизбежно сопровождают ферментационный процесс в различные фазы культивирования и при отклонении

тех или иных параметров, и целенаправленное управление этими стрессовыми воздействиями и параметрами.

Как уже было отмечено выше, вариантом такого подхода может быть рациональное сочетание стрессорных и антистрессорных факторов, при котором могут быть улучшены целевые показатели биосинтеза, что было показано ранее для продуцентов белка, этанола, биологической очистки сточных вод [179, 180, 181, 182, 183, 184]. Его примером является контролируемый оксидативный стресс, использующий избирательное усиление или подавление действия сублетальных доз активных форм кислорода (АФК), в частности H_2O_2 , на микробные культуры при одновременном действии антистрессорных факторов, в качестве которого может выступать видимый свет низкой интенсивности.

В связи с этим, в следующем разделе диссертационной работы рассмотрены различные аспекты воздействия стресса, в том числе оксидативного, на рост и физиолого-биохимические характеристики продуцентов молочной кислоты.

1.8. Стресс и стрессовое воздействие на микроорганизмы

Несмотря на большую историю исследований и отработанность методов культивирования молочнокислых бактерий не всегда протекает в оптимальных условиях. Причинами этого могут быть несбалансированность питательной среды, изменение физико-химических параметров окружения, накопление продуктов биосинтеза, ингибирующих физиологическую активность микробных клеток, популяционные изменения. При ферментации, проведенной в периодических условиях, неоптимальность обусловлена исчерпанием субстрата в конце ферментации и накоплением значительных количеств продуктов, ингибирующих биосинтез. В условиях непрерывного хемостатного культивирования неоптимальность возникает из-за лимитирования роста микроорганизмов субстратом. При высокоплотном культивировании биосинтез лимитируется исчерпанием субстрата, накоплением ингибирующих концентраций продуктов, высокой концентрацией клеток в среде, массообменными ограничениями.

Клетки микроорганизмов, подвергшиеся неблагоприятным воздействиям, находятся в состоянии стресса. Эти воздействия определяют как стрессорные.

Стрессорные факторы – это факторы абиогенного и биогенного происхождения, способные влиять на микробиологические структуры и процессы. В литературе применительно к стрессорным факторам, которые оказывают воздействие на живые объекты, используют термин «стрессоры».

В принципе, любое отклонение от оптимальных условий можно охарактеризовать как стресс. Применительно к культивированию микроорганизмов стресс можно определить, как физиологические изменения, обусловленные модификацией окружения (физические, химические, условия питания), которые могут иметь множество последствий для микроорганизмов, таких как задержка роста и гибель клеток [185, 186, 187].

Причины повышенного внимания к изучению стрессового воздействия на молочнокислые бактерии обусловлены широким практическим использованием МКБ. В частности, применяемые как пробиотики, они подвергаются агрессивному воздействию среды в пищеварительном тракте человека и животных [188, 189]. Пробиотическая устойчивость таких бактерий может быть повышена путем генетических манипуляций и сверхэкспрессии шаперонов, преэспонированием к эквивалентным стрессам (преадаптацией), образованием экзополисахаридов или модификацией состава жирных кислот клеточных мембран [190, 191]. С другой стороны, пробиотики могут выполнять защитную роль в организме-хозяине против разных видов стресса. Например, обладая антиоксидантной активностью, они помогают нивелировать неблагоприятные последствия оксидативного стресса [192; 193]. По этой причине штаммы с повышенной антиоксидантной активностью могут быть полезными для применения в медицине и промышленности.

Важные аспекты изучения стресса у молочнокислых бактерий – технологические, особенно когда важно получить жизнеспособные клетки МКБ в качестве пробиотиков или стартерных культур. В процессе выделения они подвергаются действию голодания, механического (при сепарации, центрифугировании), термического и осмотического (при сушке), холодового и оксидативного (при хранении) стрессов. Поэтому предпринимаются

многочисленные попытки повысить устойчивость МКБ к различного вида стрессам.

Воздействие сублетальных концентраций стрессовых факторов вызывает ряд адаптивных ответных реакций, направленных на преодоление стрессорного воздействия [194, 195, 196, 197], что позволяет микроорганизмам изменять синтез определенных метаболитов, лучше адаптироваться к стрессу, и тем самым выдерживать неблагоприятные условия. В этих условиях перестройка метаболизма может привести к определенным положительным эффектам, что может использоваться для совершенствования микробиологического синтеза и биодеструкции органических загрязнений [198, 199, 200].

К стрессовым относят следующие условия: голодание при недостатке или отсутствии необходимого субстрата, температурный, осмотический и рН-шок, УФ-излучение, изменение условий освещения (для светочувствительных культур), механические повреждения, действие различных окислительных агентов (оксидативный стресс) [196, 197].

Тепловой шок возникает при воздействии на живые клетки сублетальных температур, при которых физиологическая активность клетки снижается, что, однако не сопровождается автолизом, т. е. культура при этом остается жизнеспособной. Денатурация белков при этом является главной опасностью для микроорганизмов.

Понижение температуры ниже уровня физиологической активности вызывает холодовой шок, при этом вторичная структура нуклеиновых кислот стабилизируется, что приводит к ингибированию процессов репликации, транскрипции и трансляции. Кроме того, происходит снижение активности многих ферментов, а также общего метаболизма. Изменяется и текучесть мембран, что затрудняет транспорт веществ в клетку.

При повреждении клеточных структур наиболее распространенным физиологическим состоянием является оксидативный стресс. В связи с этим его считают наиболее значимым среди других видов стрессового воздействия. При воздействии на микроорганизмы агентов оксидативного стресса могут

происходить разрывы в молекулах нуклеиновых кислот, изменение пространственной конфигурации белковых молекул из-за разрывов/сшивок, что может приводить к блокированию реакционных центров ферментов [196]. Благодаря наличию в клетке антиоксидантных систем скорость реакции образования агрессивных частиц не превышает пределы физиологической нормы. Однако при усилении окислительных процессов и при недостаточной работе антиоксидантного механизма защиты развивается оксидативный стресс, причем размножение микроорганизмов сначала замедляется, а затем и вовсе прекращается. Происходит перестройка метаболизма на синтез белков, необходимых для выживания. Кроме всего прочего, активные формы кислорода также опосредованно участвуют в клеточном ответе на температурный, механический, осмотический и рН-шок, а также задействованы и при голодании.

Стрессовые факторы индуцируют возникновение в ДНК повреждений, которые устраняются с помощью различных систем репарации, одной из которых является система фоторепарации. Фоторепарация обычно происходит на фоне освещения клеток ближним УФ и видимым светом. Этот процесс связан с действием фотолиазы – фотореактивирующего фермента, являющегося флавопротеином.

Долгое время считалось, что стресс неблагоприятно воздействует на микроорганизмы, снижая их биохимическую активность и, как следствие, эффективность биосинтетических процессов. Однако, как уже было отмечено выше, стрессовое воздействие может приводить и к положительным изменениям, к улучшению отдельных показателей биосинтеза [181-184, 201]. Также было показано, что микроорганизмы, являющиеся устойчивыми к воздействию одних стрессовых факторов, иногда легко переносят воздействие других (перекрестная адаптация), не снижая при этом физиологической активности [202]. Такое положительное и перекрестное воздействие обуславливают уместность понятия контролируемого стресса как совокупности действия стрессорных и антистрессорных факторов.

Таким образом, эффективным средством совершенствования процессов культивирования и интенсификации биосинтеза целевого продукта может выступать контроль количества и качества стресс-факторов, избирательное усиление или подавление их действия на микроорганизмы.

1.8.1. Изменчивость свойств молочнокислых бактерий

Как уже отмечалось выше, при изменении (ухудшении) условий культивирования, например, при исчерпании питательных веществ, а также источников энергии или при воздействии неблагоприятных факторов, таких как антимикробные агенты, АФК и т.п., у микроорганизмов активируется ряд защитных механизмов для обеспечения адаптации в пределах физиологической нормы данного вида или для его выживания в виде анабиотических (некультивируемых) форм в условиях, непригодных для роста [203].

Так, при неоптимальных и/или неблагоприятных условиях роста у МКБ может происходить выщепление минорных фенотипов [204, 205]. Например, у *Lactococcus lactis* наблюдается диссоциация при расसेве длительно хранящихся в условиях голодания культур, причем диссоцианты имеют различные как морфологические, так и биохимические характеристики, а также отличаются устойчивостью к оксидативному стрессу и температурному шоку [206]. Также изменяется экспрессия генов стресс-ответа и утилизации углеводов, что свидетельствует о изменениях хромосомальной ДНК [207, 208].

В работе [209] была изучена генетическая и фенотипическая гетерогенность штаммов вида *Lactococcus lactis*, выделенных из традиционного итальянского сыра. Отличительной особенностью полученных изолятов являлась их способность расти в экстремальных условиях (6,5 % NaCl). Также в этой работе были получены диссоцианты штаммов вида *Lactobacillus delbreuckii* путем многократных пассажей на плотные среды, генетический контроль которых осуществлялся с помощью системы RAPD. Полученные культуры, также, как и родительские (исходные), обладали устойчивостью к высоким значениям рН и лизоциму.

Изменения свойств МКБ, приводящие к выщеплению минорных диссоциантов, могут быть обусловлены внутригеномными генетическими

перестройками [210]. По-видимому, подобные явления связаны с действием сигнальных молекул, обеспечивающих контроль экспрессии генов в стационарной фазе [211]. Такими молекулами являются, например, видонеспецифичные ауторегуляторы – аутоиндукторы анабиоза [203].

1.8.2. Оксидативный стресс у лактобацилл

Большая часть молочнокислых бактерий является микроаэрофилами, у которых отсутствует функциональная дыхательная цепь и каталазы, однако некоторые виды обладают аэротолерантностью, каталазной или псевдокаталазной активностью. МКБ при ферментации могут подвергаться воздействию аэробных условий, что в некоторых случаях приводит к образованию активных форм кислорода, при этом отдельные виды МКБ могут продуцировать большие количества пероксида водорода. В организме животных и человека МКБ могут подвергаться воздействию АФК в результате оксидативного взрыва – ответной реакции иммунной системы на чужеродные микроорганизмы.

Помимо влияния на редокс-потенциал клетки оксидативный стресс также затрагивает многие внутриклеточные ферментативные реакции. Благодаря своей высокой реакционной способности АФК повреждают важные клеточные макромолекулы, такие как ДНК, белки, липиды [191]. Однако некоторые молочнокислые бактерии, такие как *Lactobacillus paracasei*, способны «дышать» в присутствии гемов и менахинонов [9]. Необходимым условием такого «дыхания» является присутствие генов группы *cydABCD*, необходимых для синтеза цитохромоксидаз [212].

Это происходит следующим образом (рис. 3): дыхательная цепь содержит донор электрона, менахиноны (полученные путем синтеза или извне) и электронный акцептор. Цитохромоксидаза активируется при помощи гемов и менахинонов, однако для некоторых бактерий наличие менахинонов не является обязательным. В результате процесса образуется протон, который идет на образование АТФ.

При метаболизме углевода образуется необходимый для дыхания NADH. Так как у МКБ отсутствует полный цикл Кребса, углевод сначала фосфорилируется, в

ходе гликолиза образуется пируват (с образованием АТФ и NADH), пируват под действием пируватдегидрогеназы превращается в ацетил-КоА (также с образованием NADH), лактатдегидрогеназа окисляет NADH до NAD⁺, превращая пируват в лактат. В присутствии кислорода NADH окисляется до NAD⁺ либо с помощью цитоплазматической NADH-оксидазы, либо с помощью NADH-оксидазы дыхательной цепи [9]. Дыхание приводит к уменьшению количества кислорода. Однако присутствие кислорода не является столь критическим как присутствие АФК – супероксид-радикала, пероксидов, менахинона и др.

Супероксид-радикал представляет собой ион молекулы кислорода с неспаренным электроном. Сам по себе он не является сильным окислителем или восстановителем, однако некоторые штаммы (например, *E. coli*) с пониженной активностью супероксиддисмутазы (СОД, катализирует превращение супероксида в кислород и пероксид) очень чувствительны к супероксид-радикалу: происходит окисление аконитазы А, фумаразы А и В, также супероксид-радикал может вступать в реакцию с аминокислотами в белках [212]. СОД МКБ содержат в основном ион марганца, однако существуют СОД, содержащие железо и медь. Все они синтезируются в ответ на кислородный стресс [191].

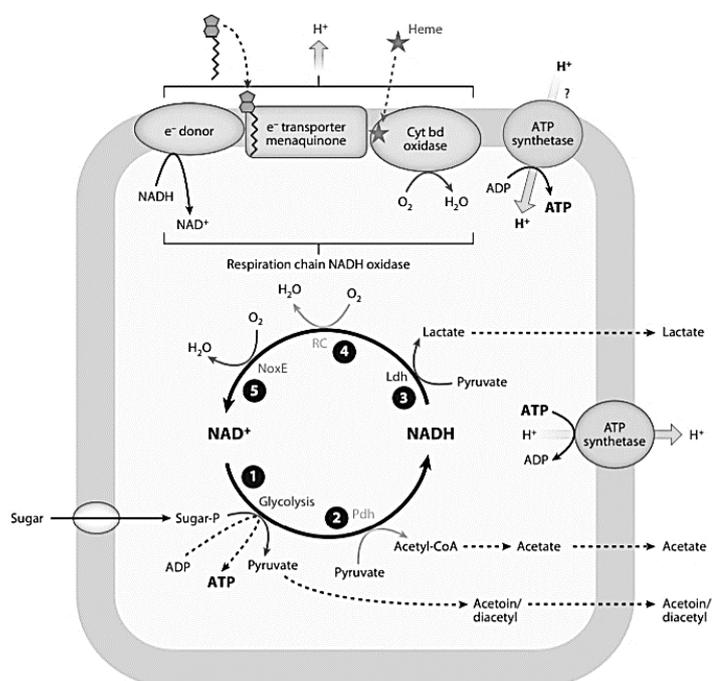


Рис. 3. Центральный углеродный метаболизм и дыхание молочнокислых бактерий [9].

Пероксид водорода – нейтральная молекула, способная проходить через мембрану клетки [212]. Она способна инактивировать белки, окисляя остатки цистеина или реагируя с катионами (например, железа, меди). Из пероксида водорода может образовываться гидроксильный радикал, который является очень сильным окислителем – он способен разрушать цепочки ДНК [191].

Основной механизм защиты от оксидативного стресса – синтез ряда ферментов. К таким ферментам относятся NADH-оксидаза/пероксидаза, СОД, цитохром с-оксидаза, каталаза.

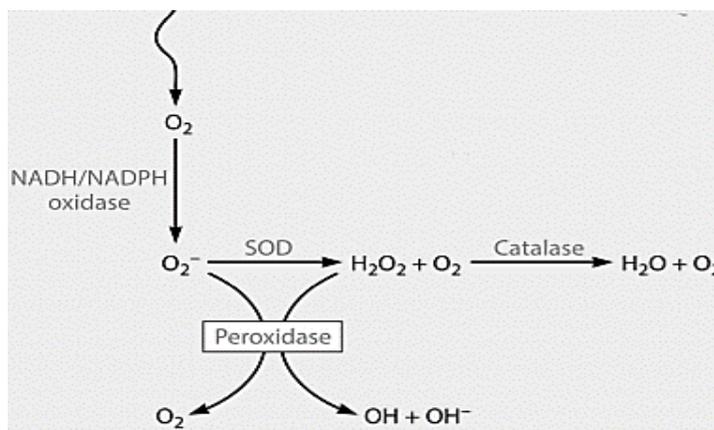


Рис. 4. Механизм защиты бактерии от воздействия кислорода [191].

Система NADH-зависимая оксидаза/NADH-зависимая пероксидаза предотвращает накопление кислорода в бактериальных клетках, производя H_2O_2 с помощью NADH-оксидазы, затем разлагая его до воды через NADH-пероксидазу [191].

Каталазы же разделяются на три класса: монофункциональные каталазы, каталазы-пероксидазы (бифункциональные молекулы), псевдокаталазы (марганцевые каталазы). Первые две группы каталаз содержат гем, у каталаз третьей группы он отсутствует [213]. Гены гем-зависимой каталазы присутствуют в штаммах *L. brevis*, *L. plantarum* и *L. sakei*, *L. casei* N87, и два штамма *L. zeae*, данные о геноме которых доступны, являются единственными лактобациллами, которые содержат как Fe-, так и Mn-зависимые каталазы.

Последовательности для синтеза супероксиддисмутазы в геноме МКБ являются относительно редкими и встречаются только в штаммах *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*) и *L. sakei*.

Также при оксидативном стрессе синтезируются некоторые белки и пептиды. Например, PerR – белок-регулятор, димер с двумя ионами металла (цинк и железо, по одному на субъединицу), с его работой также связывают ответную реакцию на стресс в присутствии ионов металлов [191]. Механизм взаимодействия может быть различен: пероксид водорода реагирует с ионом металла, что приводит к его диссоциации и к окислению гидроксил радикалом одной или более аминокислот около центра связывания; пероксид водорода реагирует с цистеином, образуя дисульфидную связь [214].

OhrR – гомодимер, регулирует экспрессию генов группы *ohr*, кодирующих тиолпероксидазу, которая превращает гидропероксиды в соответствующие спирты [212].

Кроме этого, важную роль играет глутатион, который присутствует у многих МКБ. Его наличие (и наличие его предшественников – цистеина и гамма-глутамилцистеина) важно не только при оксидативном стрессе, но и при кислотном и осмотическом. В присутствии молекул глутатиона сохраняется структура клеточной мембраны, регулируется редокс-потенциал. Представители культур *L. brevis*, *L. buchneri/parabuchneri*, *L. plantarum* и *L. casei* могут импортировать глутатион из окружающей среды и использовать его для нейтрализации негативного действия H_2O_2 . Штаммы, такие как *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, не обладающие системой транспорта глутатиона, более подвержены негативному стрессовому воздействию [215].

Для регуляции редокс-потенциала у ряда видов с недостаточным образованием глутатиона – например, у *L. casei*, недостаток глутатиона компенсируется работой системы тиоредоксин-тиоредоксинредуктаза (TRX:TrxR), которая способствует превращению дисульфида глутатиона в глутатион в присутствии NADPH, что обеспечивает постоянство редокс-потенциала [216].

Активность РНК полимеразы также контролируется группой молекул, Примером подобных молекул является ppGpp – гуанозинтетрафосфат, нуклеотид, который синтезируется не только в случае оксидативного стресса. PpGpp влияет на

инициацию транскрипции, также на поддержание гомеостаза ГТФ в клетке, однако механизмы его регуляции у молочнокислых бактерий до сих пор неизвестны [191].

Другим примером является группа белков Spx, взаимодействующих с С-терминальным доменом альфа-субъединицы РНК-полимеразы. Набор белков данной группы варьируется в зависимости от вида МКБ. Например, у *L. lactis* их семь [212].

Изучение одного из штаммов *Lactobacillus casei* N87 показало, что гены, необходимые для аэробных условий, отвечают за синтез пируватоксидазы, NADH-зависимой оксидазы, NADH-зависимой пероксидазы; гены, необходимые для дыхательного обмена, синтезируют оперон цитохромоксидазы, убихинон/менахинон С-метилазу. Исследование также выявило наличие генов, отвечающих за устойчивость к оксидативному стрессу (гемо- и марганецзависимые каталазы, тиоредоксинредуктаза, глутатионредуктаза), а также отсутствие супероксиддисмутазы [213].

L. bulgaricus может устранять кислород с помощью реакции образования H_2O_2 , тем самым предотвращая образование чрезвычайно агрессивных АФК, таких как супероксид, гидроксильный радикал и др. [214]. Однако *L. bulgaricus* не продуцирует каталазу или пероксидазу для удаления H_2O_2 , который сам по себе токсичен.

Введение гем-каталазы в молочнокислые бактерии затруднено, поэтому многие исследователи использовали марганецзависимую каталазу, тем более, что она более устойчива к повышенным температурам [216].

Для молочнокислых бактерий является обычным явлением наличие либо супероксиддисмутазы, либо высоких внутриклеточных концентраций марганца [217]. У немногих видов МКБ, таких как *L. plantarum*, марганец необходим для деградации H_2O_2 с помощью марганецзависимой каталазы. Соответствующий ген, отвечающий за синтез этого белка, был выделен и встроен в геном *L. bulgaricus* ATCC 11842, *L. casei* BL23 и *Lactococcus lactis* MG1363, однако активность фермента наблюдалась только у *L. casei*. Последняя культура имела наибольшую выживаемость в аэробных условиях [218]. Штаммы, в клетках которых не было ни

высокой концентрации марганца, ни супероксиддисмутазы, как и ожидалось, были очень чувствительны к кислороду [219]. Регуляция внутриклеточной концентрации марганца довольно жёсткая, и не зависит линейно от его концентрации во внеклеточной среде [217].

На выживание и рост МКБ при оксидативном стрессе влияют условия культивирования.

Некоторые виды МКБ, например, *L. casei*, *L. plantarum* лучше справляются с оксидативным стрессом, если в питательной среде присутствуют ненасыщенные жирные кислоты, аминокислоты L-аспарагин, L-пролин и L-серин [220].

Повышение устойчивости к H_2O_2 наблюдается при аэрации и, как правило, коррелирует с повышением концентраций каталазы и активности NADH-пероксидазы. Присутствие кислорода и кофакторов повышало устойчивость *L. plantarum* C17: при 35°C штамм выживал при концентрации 50 ммоль/л пероксида водорода по сравнению с 25 ммоль/л в анаэробии. При более низких температурах (25 °C) штамм выдерживал концентрацию 38 ммоль/л H_2O_2 в аэробных условиях роста и только 19 ммоль/л при анаэробном росте [220]. Наряду с повышением активности каталазы и NADH-пероксидазы увеличивается синтез, и активность других кислородобразующих (цитохром D, пируватоксидаза) и АФК-поглощающих ферментов (NADH-зависимая оксидаза, супероксиддисмутаза) увеличивается в респираторных фенотипах [220, 221, 222, 223, 224, 225], что обеспечивает большую выживаемость при воздействии H_2O_2 , генераторов супероксид-аниона (пирогаллола и менадиона) и гидроксильных радикалов [215]. При 35°C аэробные условия не оказывали влияние на скорость роста, однако устраняли лаг-фазу, в то же время, при 25°C удлиняли фазу адаптации [220].

В аэробных условиях, сопровождаемых генерацией АФК, концентрация молочной кислоты, как правило, ниже. Так, в исследовании, проводившемся с *Lactobacillus delbrueckii* и *L. bulgaricus* [226], общая концентрация накапливаемой молочной кислоты к стационарной фазе роста была значительно ниже в аэробии для всех исследованных штаммов. Выход молочной кислоты от субстрата также

всегда был ниже, чем ожидалось для гомоферментативного брожения (2 моль молочной кислоты на моль глюкозы).

Способ ферментации также влияет на устойчивость к оксидативному стрессу. В работе [221] *L. plantarum* C17 выращивали в трёх режимах: непрерывном, с подпиткой, периодическом. Культура подвергалась воздействию H_2O_2 в концентрациях от 0,8 до 0,0015 моль/л. Устойчивость к оксидативному стрессу за счёт выработки каталазы была выше у культуры, выращиваемой в режиме ферментации с подпиткой, и у культур, находящихся в непрерывном режиме ферментации с наименьшей скоростью разбавления.

Устойчивость МКБ повышается при преадаптации популяции к АФК. Так, 80% мутантных штаммов анаэробных и 100% аэробных преадаптированных к агентам окислительного стресса культур у *L. plantarum* показывали лучшие ростовые характеристики по сравнению с диким штаммом C17 как в анаэробных, так и в аэробных условиях [221]. Такое повышение устойчивости *L. plantarum* связывают не с прямым мутагенным действием H_2O_2 , которое практически нивелируется благодаря высокой каталазной активности [227], а с адаптивной эволюцией, протекающей в условиях действия селективного фактора и естественного отбора [221].

У молочнокислых бактерий важную роль в ответе на оксидативный и перекрестный стрессы играет фактор CcpA (catabolite control protein), представляющий собой разновидность регуляторного белка с множественными эффектами. В ходе исследования [226] было показано влияние инактивации CcpA и аэробных условий на рост, метаболизм и устойчивость к стрессу при нагревании, окислительных и холодových стрессах у *Lactobacillus delbrueckii* и *L. bulgaricus*. Роль CcpA в регуляции метаболизма изучалась и для других видов МКБ, включая *L. lactis* [228, 229], *Lactobacillus casei* [230], *Lactobacillus pentosus* [231] и *L. plantarum* [232, 233].

Исследование, описанное в [228], продемонстрировало важность CcpA как глобального регулятора у *L. lactis*, так как делеция CcpA из генома *L. lactis* изменила экспрессию почти 13% всех генов. Удаление гена CcpA привело к

понижению скорости роста мутанта *L. lactis* и усилению экспрессии большого количества генов, подтверждая гипотезу о том, что CsrA играет роль плейотропного репрессора. Также для ряда генов уровень экспрессии был ниже у мутанта, чем у его родителя, что свидетельствует о том, что экспрессия этих генов активируется с помощью CsrA. Наибольшие прямые эффекты наблюдались в экспоненциальной фазе роста и около неё. Влияние мутации CsrA на экспрессию генов в стационарной фазе было менее выраженным. Большинство эффектов, наблюдаемых в стационарной фазе, возможно, было косвенным: изменение экспрессии могло быть вызвано изменениями среды.

Внутриклеточные пути и системы ответа на стресс, предохраняющие и устраняющие повреждения макромолекул, и изменения метаболических путей у МКБ при сублетальных стрессах представлены на рис.5. При стрессовых условиях у МКБ возникают выраженные метаболические нарушения (рис. 6). В результате воздействия стрессоров клетки снижают свою метаболическую активность, количество вырабатываемой клетками энергии и протон-движущую силу, подавляются гликолитические пути [234], рост и жизнеспособность клеток при этом меняются [191].

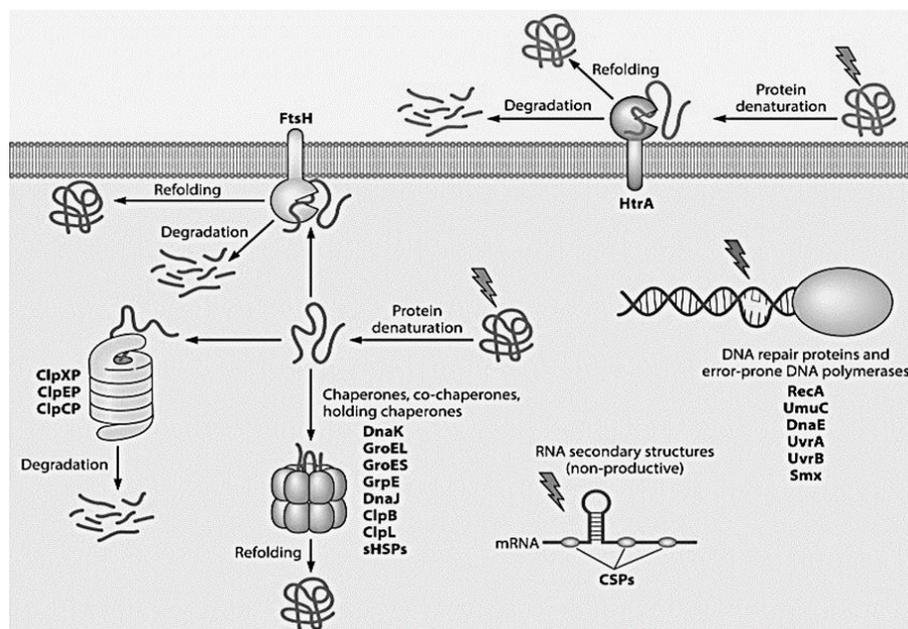


Рис. 5. Схематическое представление основных внутриклеточных путей и систем ответа на стресс, предохраняющих и устраняющих повреждения макромолекул у МКБ.

В целом, метаболические ответы на стресс заключаются в использовании других источников углерода, активации протеолитической системы и/или катаболизма свободных аминокислот клетками. Метаболическая адаптация имеет решающее значение для выживания клеток, поскольку она стимулирует выработку дополнительной энергии и снижает негативное воздействие стрессоров [191]. В этих условиях способность МКБ эффективно транспортировать и метаболизировать углеводы и другие источники углерода, такие как малат и цитрат, имеет решающее значение для роста микроорганизмов и их продуктивности.

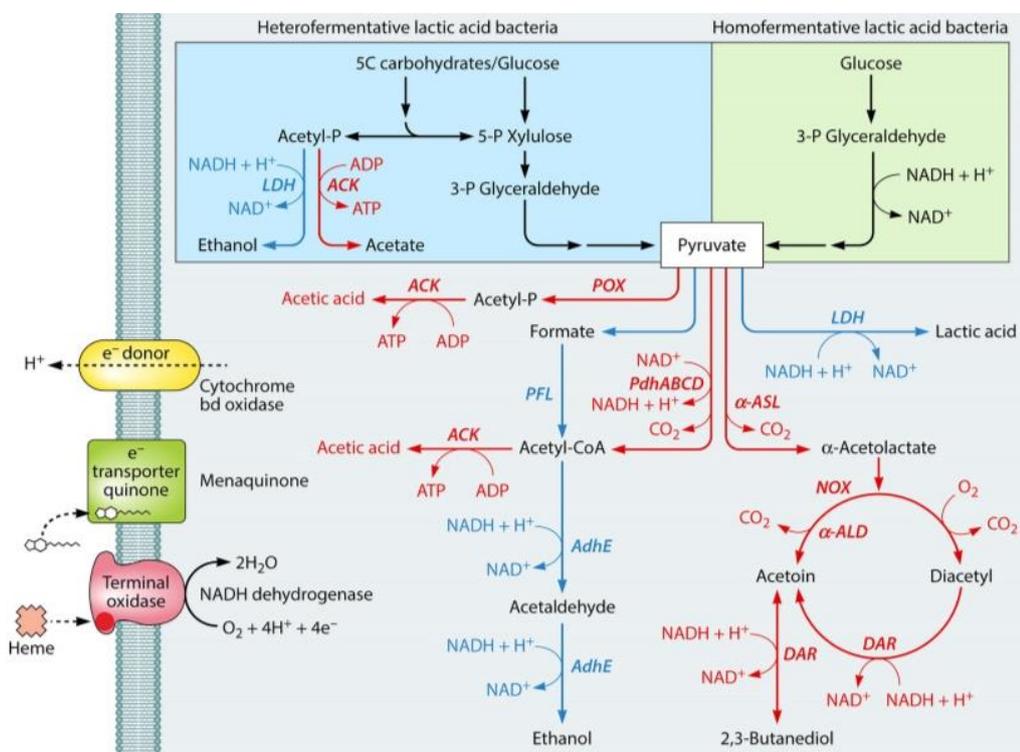


Рис.6. Схематическое изображение изменений метаболизма углеводов, гликолиза и метаболического пути пирувата у МКБ [191]. Черные стрелки и названия ферментов – общие реакции; синие – те, что индуцируются при культивировании нестрессированных МКБ; красные – те, что индуцируются в респираторных и/или подверженных стрессовому воздействию окружающей среды клетках. Ферменты:

LDH- лактатдегидрогеназа, **ACK** – ацетаткиназа, **POX** – пируватоксидаза, **PFL** – пируватформилатлиаза, **PdhABCD** – пируватдегидрогеназный комплекс, **ASL** – ацетолактатсинтаза, **AdhE** – алкогольдегидрогеназа, **NOX** – NADH оксидаза, **ALD** – ацетилдекарбоксилаза, **DAR** – диацетилредуктаза.

Степень метаболических изменений и адаптации, а также основные способы перепрограммирования метаболических путей, отвечающих за катаболизм субстрата или адаптацию к стрессорам, зависит от видов МКБ и условий адаптации [191].

Например, кислотный стресс вызывает внутриклеточное закисление, которое снижает активность цитоплазматических ферментов. В условиях кислотного стресса у *L. casei* и *S. mutans* заметно снижается синтез системы фосфоенолпируват-фосфотрансферазы (PEP-PTS) для глюкозы, которая является основной системой транспорта углеводов [191]. В тех же условиях устойчивая к действию кислот культура *L. casei* демонстрирует высокую концентрацию PEP-PTS и белка HPr. Таким образом, высокая концентрация PEP-PTS может повышать устойчивость к кислоте [191]. При оптимальных условиях и при росте клеток в средах, богатых глюкозой, HPr ингибирует PEP-PTS для всех углеводов, отличных от глюкозы, предотвращая их транспорт в клетку. Кроме того, гликолитические интермедиаты (например, фруктозо-1,6-бисфосфат) активируют фосфорилирование HPr по остатку серина в положении 46 [191]. Полученный комплекс Ser-HPr взаимодействует с регулятором транскрипции CsrA, что предотвращает катаболизм источников углерода, отличных от глюкозы. В условиях низкого pH некоторые МКБ увеличивают активность пируваткиназы, что может ускорять уменьшение уровня фруктозо-1,6-бисфосфата, ослабляя репрессию CsrA и позволяя использовать альтернативные источники углерода [235].

Проведенные транскриптомные и протеомные исследования показали, что некоторые МКБ, например, *L. sakei* и *L. helveticus*, повышают уровень гликолитических ферментов под действием кислотного, теплового и осмотического стресса, но при этом не происходит увеличения синтеза молочной кислоты [236, 237].

1.8.3. Тепловой шок

Одной из наиболее изученных антистрессорных систем ответа является система ответа на тепловой шок. Для всех живых организмов характерен синтез

белков теплового шока (БТШ или HSP) при увеличении температуры. Данный тип стрессорных белков имеет консервативный характер, на что указывает, например, 90%-ая гомология отдельных участков белков теплового шока бактерий и человека.

Основной функцией белков теплового шока является правильная укладка вновь синтезированных полипептидных цепей и перестройка их в том случае, если они были неверно уложены и/или повреждены.

Наибольший ущерб, вызываемый высокими сублетальными температурами, заключается в денатурации белков, однако мембраны органелл и нуклеиновые кислоты также могут повреждаться при сублетальном термическом воздействии [238]. Стресс, вызываемый высокой температурой, также нарушает трансмембранный протонный градиент, что приводит к снижению внутриклеточного pH [239-241]. Когда клетки подвергаются тепловому шоку, возникают реакции, приводящие к усиленному синтезу группы эволюционно-консервативных БТШ [242-244], которые способствуют правильному складыванию зарождающихся полипептидов, сборке белковых комплексов, деградации и транслокации белков [245].

Пробиотические культуры и инокуляты обычно хранятся в форме лиофильно высушенных препаратов (с добавлением криопротекторов для поддержания жизнедеятельности), то есть могут сталкиваться не только с тепловым шоком, но и с холодовым, хоть он и не так распространен [191].

К БТШ относятся шапероны, протеазы и некоторые другие белки. Белки теплового шока присутствуют у всех бактерий, между ними есть отличия в составе и свойствах БТШ, экспрессии генов, а их регуляция осуществляется на уровне транскрипции [246].

Шапероны отвечают за восстановление структуры белка и подразделяются на несколько классов в зависимости от молекулярной массы: HSP90, HSP70, HSP60 и др.

HSP90 – димерный шаперон, обладает киназной активностью, что предполагает возможность его взаимодействия с денатурированным белком [247]. Он присутствует у *E. coli* и некоторых бактерий, однако отсутствует у МКБ [248].

Самым известным представителем семейства HSP70 является DnaK. Он способствует поддержанию структуры синтезированных белков, восстанавливает структуру денатурированных и агрегированных белков, участвует в их транспорте. HSP70 состоит из N-терминального домена (нуклеотид-связывающий домен, НСД, 44кДа) и С-терминального домена (субстрат-связывающий домен, ССД, 25 кДа), которые соединены последовательностью из 10 остатков аминокислот. ССД же состоит из β - субдомена (17 кДа), кэпированный α -спиральным субдоменом (10кДа). DnaK, связанный с АТФ, обладает низким сродством к субстрату, то есть скорость высвобождения и связывания с субстратом очень высокая, в то время как DnaK, связанный с АДФ, – высоким сродством (рис. 7). DnaK обладает шаперонной активностью в присутствии кошаперонов DnaJ и GrpE: DnaJ индуцирует связывание субстрата с ССД и повышает АТФазную активность, GrpE же способствует высвобождению субстрата, он действует как термосенсор при температуре выше 40 °С. Однако до сих пор не до конца ясно, как именно данные циклы связывания-высвобождения способствуют фолдингу белка [248]. Важная роль DnaK была доказана с помощью мутантов *L. lactis* по гену *dnaK* [246], однако присутствие DnaK важно для клетки только при температурах выше 37 °С. Кроме того, он задействован в ответных реакция на осмотический стресс (2,5% NaCl) и кислотный (рН ниже 5.5) [248].

Еще одним примером шаперонов является GroEL, его масса составляет 60 кДа (HSP60) и для его функционирования необходим кошаперон GroES [191]. GroEL обладает схожими с DnaK функциями [247] и отвечает за фолдинг денатурированного белка. Но в отличие от DnaK, присутствие GroEL в клетке является существенным фактором при любых температурах [248].

Кроме вышеупомянутых белков теплового шока существуют sHSPs – маленькие белки теплового шока. В отличие от других они различны по размеру и последовательности, количеству субъединиц. В основном они взаимодействуют с денатурированными белками, предотвращая их агрегацию, и поддерживают их фолдинг (рис. 8). Связываясь с субстратом, они переносят белки к АТФ-зависимым шаперонам (например, DnaK и ClpB) для рефолдинга. В условиях, когда sHSPs не

нужны, они существуют в неактивной форме в виде олигомеров, которые не способны взаимодействовать с белками. При возникновении стрессовых условий они превращаются в активную форму.

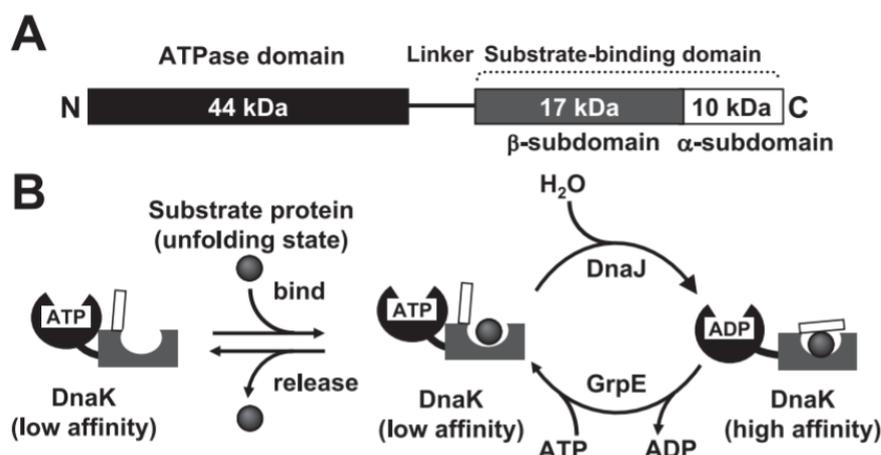


Рис. 7. Модель рабочего цикла DnaK у *E. coli*. (А) Структура DnaK. (В) Гидролиз нуклеотида в присутствии DnaJ и GrpE [248].

Наиболее подробно описан sHSP Lo18, который был обнаружен у *O. oeni*. Также к sHSPs относят HSP20 (*Bifidobacterium breve*), HSP18.5 и HSP19.3 (*Lactobacillus plantarum* WCSF1) и другие [248].

Помимо важных белков теплового шока, упомянутых ранее, в адаптации к резкому повышению температуры участвуют и другие молекулы. К генам, которые экспрессируются в подобных условиях, относится и ген *htrA*, который кодирует белок DegP, также известный как HtrA (high temperature requirement protein A). HtrA комбинирует в себе и шаперонную, и протеолитическую активности [246]. Он участвует в деградации внеклеточных полипептидов и неправильно свернутых белков. Мутант *L. lactis* по *htrA* термочувствителен, что доказывает значительную роль HtrA при тепловом стрессе [191], однако механизм его регуляции до сих пор не изучен.

Еще один белок теплового шока – FtsH, связан с мембраной клетки, обладает и шаперонной, и протеолитическими активностями. Пока не ясна роль FtsH у молочнокислых бактерий в условиях теплового стресса, но было выяснено, что при инактивации *ftsH* у *L. plantarum* снижается толерантность к повышению температуры и гиперосмотическим условиям.

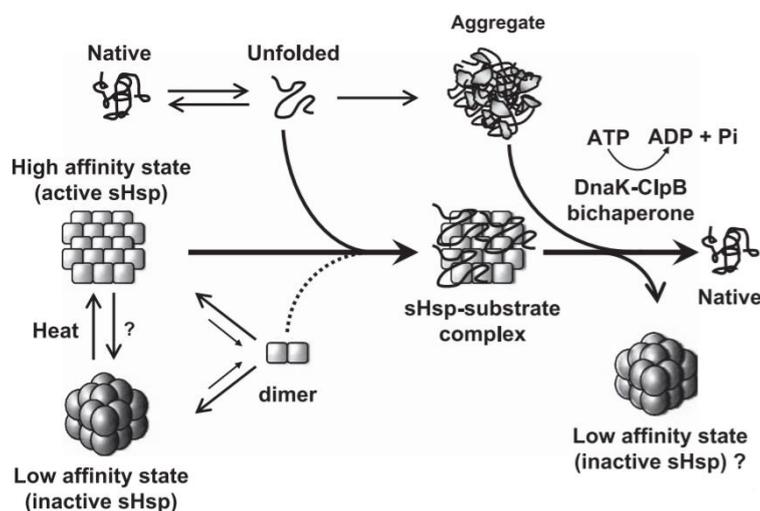


Рис. 8. Механизм взаимодействия sHSP с субстратом [248].

Белок RecA играет важную роль в репарации ДНК. Мутант *L. lactis* по *recA* отличался термочувствительностью, что доказывает связь между тепловым шоком и ДНК репарацией. Однако не у всех молочнокислых бактерий SOS репарация регулируется белком LexA: у семейства *Streptococcaceae* был обнаружен регулятор HdiR [246].

В технологических процессах тепловой стресс у МКБ обычно изучают путем анализа его влияния на рост, термоустойчивость и синтез целевых продуктов биосинтеза в связи с возникающими задачами повышения или снижения резистентности лактобацилл к тепловому стрессу, распылительной сушке, при хранении. На устойчивость популяции к этим воздействиям влияют генетическая гетерогенность среди видов, физиологический статус клеток и другие факторы окружающей среды (среда роста, pH, активность воды, содержание солей и консерванты), а также преадаптация к стрессу [249, 250].

Возникновение толерантности к тепловому шоку после умеренного теплового воздействия обнаруживалось у *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* LC301, *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 [249], *Lactobacillus delbrueckii* [250], *Lactobacillus helveticus* LH212 [251], *Lactobacillus collinoides* [252] и *Lactobacillus plantarum* [253]. Исследования по термостойкости *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* указывают, что существуют варианты и с более высокой термостойкостью [254].

При холодовом шоке рост бактерий сначала прекращается, возобновляясь через какое-то время, но с меньшей скоростью. При резком понижении температуры уменьшается текучесть мембраны, замедляется фолдинг белков, затрудняется функционирование рибосом, равно как и трансляция и транскрипция за счет изменения вторичной структуры ДНК и РНК. При низких температурах синтезируются низкомолекулярные белки холодового шока (CSPs). Они способны связываться с нуклеиновыми кислотами и восстанавливать их вторичную структуру [191].

1.8.4. Осмотический стресс

МКБ могут подвергаться осмотическому стрессу, например, при производстве кисломолочной продукции и сыров – концентрация соли в некоторых сырах достигает 2,8%, в других продуктах она может быть еще больше (*Tetragenococcus halophila*, используемая при производстве японских соусов, может сталкиваться с концентрацией соли до 18%). Также пробиотические культуры бактерий испытывают осмотический стресс при прохождении по пищеварительному тракту человека [246].

Резкое повышение осмотического давления при осмотическом шоке ведет к перемещению воды из клеток наружу, результатом чего является уменьшение тургора в клетках, изменение их объема и внутриклеточной концентрации ионов.

В гипотонических растворах клетка набухает и разрывается, в гипертонических происходит дегидратация клетки, результатом чего является уменьшение тургора в клетке, изменение её объема и внутриклеточной концентрации ионов, также происходит плазмолиз – отделение протопласта от клеточной стенки бактерий. Все эти явления могут серьезно повлиять на жизнеспособность клетки, так как считается, что именно поддержание постоянного тургора является движущей силой для развития и роста клетки. Вода поступает в клетку (и из клетки) с помощью диффузии через специальные каналы – аквапорины. Аквапорины относятся к семейству основных внутренних белков, к которым также относятся акваглицеропорины, пропускающие и некоторые другие молекулы (глицерин и другие многоатомные спирты, диоксид углерода, мочевины

и др.). Синтез аквапоринов индуцируется при помещении клетки в гипертонический раствор, что доказывает их важную роль в защите бактерии от осмотического шока [246].

Важную роль в регуляции осмотических явлений играет клеточная оболочка, которая способна поддерживать форму клетки и выдерживать осмотическое давление, достигающее 2 МПа в грамположительных бактериях. В ответ на осмотический стресс молочнокислые бактерии начинают накапливать осмопротекторы – в основном это бетаин, холин, карнитин. Накопление данных веществ повышает предел толерантности бактерий. Так как молочнокислые бактерии не способны синтезировать многие вещества, они используют вышеупомянутые соединения из ферментационной среды.

У *L. plantarum* повышение осмоустойчивости достигается при наличии в среде L-карнитина, бетаина и пролина. Бетаин обладает наибольшей эффективностью. Однако *O. oeni* является исключением – на наличие в среде подобных осмолитов клетка никак не реагирует [246].

Некоторые аминокислоты (пролин, глутаминовая кислота, иногда аланин) тоже играют важную роль при возникновении осмотического стресса. Молочнокислые бактерии могут накапливать некоторые аминокислоты (пролин, глутаминовую кислоту, иногда аланин), что уменьшают воздействие на них возникающего осмотического стресса [191]. Данный эффект наблюдался при добавлении в среду пролина для роста *L. lactis* и *Pediococcus pentosaceus* и добавлении аспартата в среду роста *Oenococcus oeni* [191]. При добавлении в среду ди- и трипептидов наблюдается схожий эффект. Дипептиды, содержащие пролин (Pro-Leu и Leu-Pro), обладают высокой эффективностью, даже выше, чем свободные аминокислоты [255]. Они помогают восстановить сверхспирализацию ДНК, которая меняется при нахождении клетки в гиперосмотической среде [246].

Как упоминалось выше, молочнокислые бактерии не синтезируют необходимые для поддержания осмотического давления вещества. Накопление осмолитов из среды обусловлено транспортерами, которые переносят молекулы через мембрану против градиента электрохимического потенциала с затратой

энергии [256]. Взаимодействие транспортеров с мембранными липидами обуславливает их активность в ответ на изменение осмотического давления. У *L. lactis* поглощение бетаина и пролина контролируется опероном *opuA/busA*. Данный оперон кодирует транспортеры семейства ABC, которые используют две молекулы АТФ при транспортировке одной молекулы бетаина. Активность транспортера *OpuA/BusA* зависит от изменения во внутриклеточной ионной силе и электростатического воздействия между самим транспортером и клеточной мембраной. *OpuA* состоит из трех компонентов: *OpuAA* – АТФаза, *OpuAB* – интегральный белок, *OpuAC* – внеклеточный белок, связывающийся с субстратом [191]. *OpuA* был изучен у *B. subtilis*, его структура такая же и у молочнокислых бактерий. *OpuA* и *BusA* обладают схожим строением, что можно увидеть на рис. 9 [257, 258].

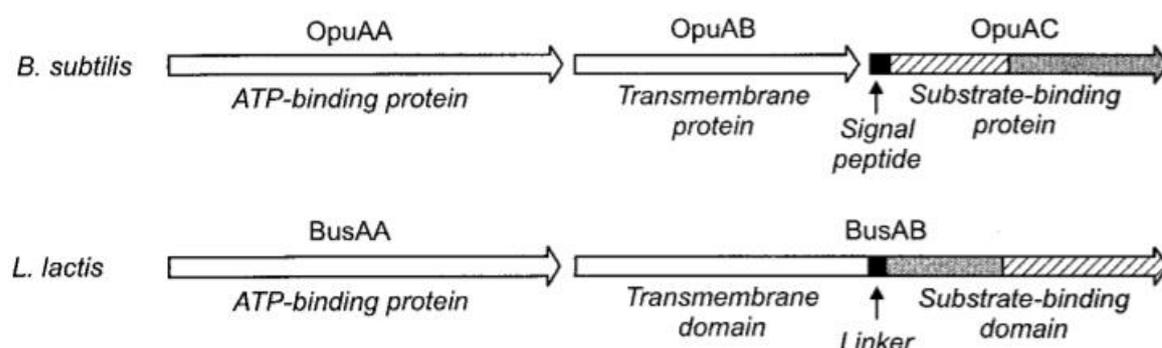


Рис. 9. Строение *OpuA* и *BusA* у *B. subtilis* и *L. lactis* соответственно.

Схожие участки отмечены одинаково [258].

Экспрессия *OpuA/BusA* репрессируется регулятором *BusR*, который связывается с промотором *busA* в зависимости от ионной силы: при повышенной ионной силе цитоплазмы он диссоциирует с сайта связывания, что индуцирует экспрессию *busA* [191].

Другим транспортером семейства ABC является *ChoQS*, который переносит холин [246]. У *L. lactis* ген *choS* индуцируется осмотическим стрессом, а гены *choS* и *choQ* и осмотическим, и кислотным [259]. Поглощение же осмолитов у *L. plantarum* обуславливается работой полуконститутивной системы *QacT* (транспортирует четвертичные аммонийные соединения), которая обладает большим сродством к бетаину. Система является полуконститутивной, так как

наличие пролина и бетаина в среде не оказывают сильного эффекта на экспрессию генов [260]. Однако она, судя по всему, активируется при изменении тургора клетки [246].

При осмотическом стрессе происходит синтез стрессорных белков, общих для различных стрессорных воздействий – при критических значениях температуры, рН и т. д. К ним относятся шапероны и протеазы: шапероны DnaK, GroEL и GroES, и др.

1.8.5. Перекрестное стрессовое воздействие

Микроорганизмы, адаптировавшиеся к воздействию одних стрессорных факторов, часто становятся к ним менее чувствительными и более устойчивыми к воздействию других стресс-факторов, при этом физиологическая активность микроорганизмов не снижается. Это явление получило название *перекрестной адаптации*, а подобное стрессовое воздействие, когда микроорганизм подвергается воздействию сразу нескольких стрессорных факторов, называется *перекрестным стрессом* или *перекрестным стрессовым воздействием* [261].

Рис. 10 иллюстрирует суммарные сведения о различных вариантах воздействия стресс-факторов и системах ответа на множественный стресс у МКБ.

В целом, резистентность, обеспечиваемую системой защиты, можно разделить на два типа. Первый тип включает в себя ответ, индуцированный сублетальной дозой химического или физического воздействия (например, на тепловой шок), который позволяет сохранять выживаемость в случае последующего воздействия большей дозы того же фактора. Второй тип состоит из более общих систем, и предварительная адаптация к одному стрессовому воздействию может обеспечить резистентность клеток в условиях другого вида стресса, т.е. обуславливает перекрестную адаптацию [191].

Перекрестная адаптация часто возникает между осмотическим, оксидативным и тепловым стрессами. Так, штамм *L. paracasei* NFBC 338, предварительно преадаптированный к осмотическому шоку путем экспозиции с 0,3М NaCl, был значительно более устойчив к тепловому стрессу (60°C в течение 30 мин), процент

выживаемости составил 33,5% против 0,1% для неадаптированных контрольных клеток культуры [249].

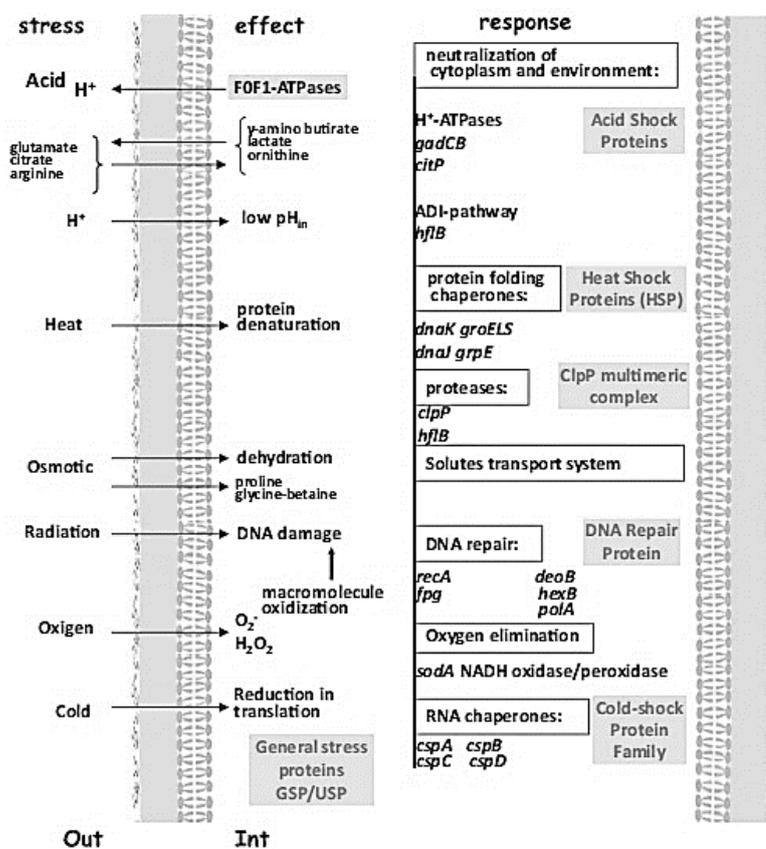


Рис.10. Антистрессорные ответы на различные виды стресса у МКБ [261].

Предварительная обработка *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 0,4М NaCl повысила терморезистентность для всех тестируемых штаммов, однако обработка 0,66М раствором трегалозы и 0,48М сахарозы не принесла желаемого результата [250].

Культура *L. acidophilus*, предварительно адаптированная к воздействию NaCl, была значительно более устойчива при последующем воздействии желчи и тепловом шоке, чем контрольная культура, не подвергавшаяся преадаптации [205].

Предварительная обработка солями желчи и H₂O₂ оказалась неэффективной, тогда как адаптация к стрессовому воздействию путем преобработки NaCl значительно повышала термостойкость пробиотической культуры *L. paracasei* NFBC 338 [249].

С другой стороны, молочнокислые бактерии *L. paracasei*, преадаптированные к стрессовым условиям при помощи пероксида водорода, могут выдерживать экспозицию до часа, не теряя своей жизнеспособности, при концентрациях солей до 1,5-2 М [190, 191].

Умеренный тепловой шок (например, поддержание температуры на 10°C выше оптимальной), обычно индуцирует синтез HSP во многих видах МКБ, включая *L. helveticus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii* [190, 251], *L. collinoides* [252], *L. sakei* [237] и *L. paracasei* [249]. При помощи двумерного электрофореза было обнаружено различное число стресс-индуцированных белков у различных видов МКБ: 24 в клетках *L. acidophilus* NCFM, 15 – в клетках *L. casei* LC301, 18 – в клетках *L. helveticus* LH212 [248] и 36 – в клетках *L. collinoides* [252]. Синтез десяти белков в *L. collinoides* был индуцирован тепловым воздействием и обработкой этанолом, а еще четырех – тепловым шоком и при действии кислоты.

В перекрестных ответах участвуют шапероны семейств 70 кДа (DnaK) и 60 кДа (GroEL), которые функционируют с дополнительными белками DnaJ и GrpE, GroEL и GroES [243, 245, 251]. Структура *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* оперона общая для *L. sakei* [237], *L. johnsonii* and *L. acidophilus* [262], что предполагает его участие в различных системах стресс-ответа. Аналогично, строение шаперона groE весьма консервативно. Оно одинаково у *L. johnsonii* и *L. acidophilus* [262], *L. helveticus* [251]. Максимальная транскрипция groESL отмечалась для *L. johnsonii* VPI11088 после теплового воздействия при 55°C в течение 15-30 мин. Индукция оперона *groESL* в клетках *L. johnsonii* при помощи теплового шока также повышала их устойчивость при замораживании. Повышение концентрации GroES и GroEL в цитоплазме клеток влияет на жизнеспособность и метаболическую активность клеток лактобацилл во время и после создания заквасок с использованием замораживания, лиофилизации или распылительной сушки.

В составе гена *dnaJ* в *hrcA-grpE-dnaK* опероне нескольких молочнокислых бактерий был найден элемент CIRCE [263-267]. Анализ сайта начала транскрипции показал, что оперону *dnaK* у *L. sakei* предшествует промотор σ^A -типа, и что этот участок варьируется в зависимости от условий стресса [264]. Анализ мРНК в *L.*

sakei, *L. johnsonii* и *L. acidophilus* показал, что оперон *dnaK* регулируется на уровне транскрипции и что транскрипция вызывается тепловым воздействием, а также при воздействии солей (осмотический шок) и этанола [264, 268].

В то время как двойные элементы CIRCE фланкируют промоутер гомолога *hrcA* в опероне *dnaK* в клетках *L. lactis subsp. lactis* [265], другие опубликованные последовательности изолированных CIRCE для лактобацилл показывают единичные случаи инвертированных повторов. Schmidt et al. [264] показали, что белок HrcA у *L. sakei* выполняет функции отрицательного регулятора, подавляющего экспрессию *dnaK* оперона в отсутствие теплового шока путем взаимодействия с цис-элементом CIRCE. В отличие от термоиндуцируемых «шоковых» генов *B. subtilis* I класса, транскрипционная индукция оперона *dnaK* у *L. sakei* [264], *L. acidophilus* и *L. johnsonii* также происходит при тепловом воздействии и обработке этанолом [268]. Индукция при обработке этанолом указывает на то, что участие шаперонного комплекса DnaK-DnaJ-GrpE в общей реакции на стресс весьма схожа с CIRCE независимой экспрессией σ^B -зависимых стресс-белков II класса у *B. subtilis* [264]. Ген *htrA*, который предположительно кодирует мембранную сериновую протеиназу семейства HtrA/DegP, также может участвовать в реакции на тепловой стресс [269]. Экспрессия hTRA в клетках *L. helveticus* возрастала в 8 раз в ответ на воздействие 4% NaCl [270]. Действие этанола либо теплового шока (37-52°C) на растущие клетки приводило к значительному увеличению *htrA* экспрессии. Интересно отметить, что ответ на тепловой шок у *L. helveticus* при несколько других условиях воздействия (37-48°C) носит иной характер. В частности, при 48°C количество *htrA* транскриптов быстро снижалась в промежуток между 10 и 20 мин после теплового воздействия и оставалось после этого на очень низком уровне.

Таким образом, на клеточном уровне выявлен широкий спектр механизмов, генетических и биохимических систем, поддерживающих метаболический гомеостаз и повышающих выживаемость клеток в условиях стресса. В стресс-ответе могут участвовать осмопротекторы (при осмотическом стрессе), химические шапероны (при тепловом шоке), видимый свет (при фоторепарации),

антиоксидантные системы (при оксидативном стрессе) и другие факторы, которые можно отнести к антистрессорным. Различные виды стресса могут индуцировать общие компоненты в системах ответа, и часто эти ответы регулируются одними и теми же внутриклеточными факторами, и сигнальными каскадами.

В ответе микроорганизмов на стрессовое воздействие важную роль играют физиологическое состояние, условия аэробно-анаэробного роста, плотность популяции, процедура преадаптации к стрессору.

Индукция генов, участвующих в ответе на стресс, зависит от фазы роста клеток (экспоненциальная или стационарная), и их продукты участвуют в развитии перекрестной устойчивости [189, 269-271]. Условия медленного роста или истощения питательных веществ ведут к стационарной фазе, которые улучшают общий ответ на стресс, индуцируют механизмы перекрестной защиты [246, 272].

Способность микроорганизмов адаптироваться к различным стрессам также зависит от их физиологического состояния и условий роста: субстрата в питательной среде [273], условий аэрации [274, 275], плотности клеток в популяции [276], фазы роста [277-279] и других факторов.

Возможна и обратная ситуация, когда клетки, подверженные воздействию одного вида стресса, становятся менее устойчивыми к другому стрессу [273].

У молочнокислых бактерий наблюдается повышение устойчивости при их преадаптации к оксидативному стрессу [215]. При экспонировании к сублетальным концентрациям H_2O_2 *Lactococcus lactis* может выживать в присутствии более высоких, летальных концентраций H_2O_2 . Рост в условиях дыхания также повышает устойчивость к оксидативному стрессу. Синтез и повышение активности ферментов антиоксидантного ответа в условиях дыхания способствует большей выживаемости при экспонировании к H_2O_2 , генераторам супероксида (например, пирогаллолу и менадиону) и гидроксильным радикалам [10, 222, 280, 281, 282].

Лактобациллы (*L. casei* и *L. plantarum*) лучше справляются с оксидативным стрессом, если в питательной среде присутствуют ненасыщенные жирные кислоты, аминокислоты L-аспарагин, L-пролин и L-серин [280]. Выживаемость также резко повышается при внесении защитных веществ: аргинина, аспарагиновой кислоты,

гистидина, глутатиона, глюкозы, твин 80, цитрата [283]. Также на выживание и рост в аэробных и окислительных условиях влияет температура. Так, при 35°C аэробные условия не оказывают влияние на скорость роста, однако устраняют лаг-фазу; в то же время, при 25°C удлиняется фаза адаптации [280].

Брюханов и Нетрусов [284] проанализировали влияние аэриоза на облигатно анаэробные промышленные культуры микроорганизмов, его связь с окислительным стрессом и антиоксидантными системами защиты применительно к условиям хранения жизнеспособных культур. Обращается внимание, что эффективной мерой защиты против окислительного стресса являются внесение антиоксидантов (цистеина, аскорбиновой кислоты, дрожжевого экстракта) и восстановителей в небольших концентрациях в питательные среды, а также внесение гемина для стимулирования синтеза каталазы. С другой стороны, внесение в питательные среды некоторых антиоксидантов, в частности, аскорбиновой кислоты, в более высоких концентрациях провоцируют образование АФК, что отрицательно влияет на жизнеспособность микроорганизмов.

В практическом плане процедура адаптации (преадаптации) необходима, когда речь идет о получении линий микроорганизмов, устойчивых к стрессу, и их использовании в управляемом культивировании, при целенаправленной индукции компонентов стресс-ответа. Преадаптация к различным стрессам (солевому, низкому рН, желчи, высоким температурам и др.) может быть использована при получении штаммов, устойчивых к другим видам стресса, как стратегия для усиления технологических качеств пробиотических лактобацилл [285, 286].

Повышение устойчивости культур МКБ к окислительному стрессу и выхода биомассы в аэробных условиях культивирования имеет практическое значение для получения промышленных стартерных культур пищевого назначения или пробиотиков с улучшенными технологическими свойствами [222, 280, 287-292].

У МКБ, как и других микроорганизмов, возможны перекрестные реакции между ответом на стресс и различными системами репарации. Перекрестные реакции наблюдаются и между ответом на окислительный стресс и репарацией, в частности, в отношении действия УФ/Н₂О₂, между репарацией и тепловым шоком,

а также между фоторепарацией и ответом на тепловой шок [271, 293, 294]. Поскольку возникают различные повреждения, можно полагать, что множество систем репарации функционируют кооперативно.

Фоторепарация (фотореактивация) относится к числу наиболее важных и распространенных систем репарации, протекающей у микроорганизмов [295-304], наличие которой у молочнокислых бактерий было показано еще в 1959 г. [305].

Фоторепарация возникает на фоне освещения клеток видимым или ближним УФ-светом, заключается в разрезании димеров, которые образуются из пиримидиновых остатков тимина в ДНК, а также димеров в РНК, что позволяет устранить вредные эффекты. Данный процесс связан с действием одиночного фермента фотолиазы (ЕС 4.1.99.3, фотореактивирующего фермента, PRE), являющегося флавопротеином и кодируемого геном *phr*. Отличительная черта фотолиаз – высокий квантовый выход реакции при поглощении света и их крайне низкие концентрации во всех организмах, обладающих им (около 10-20 молекул на клетку в *E. coli*), поэтому, в частности, в стрессированных клетках и организмах, когда наблюдается экспрессия фотолиазы и механизм фоторепарации, физиологические изменения могут проявляться уже при уровнях освещенности объекта, существенно более низких, чем при фотосинтезе [306].

Показано, что фотолиаза индуцируется активными формами кислорода (H_2O_2 и др.) и химическими агентами, повреждающими ДНК в дополнение к УФ-радиации. Индукция фотолиазы в клетках усиливается видимым светом. Эти результаты предполагают вовлеченность оксидативного стресса в индукцию фотолиазы [307, 308].

Фоторепарация с участием фотолиазы является в настоящий момент единственной ферментной реакцией, где фактором активации служит не химическая энергия, а энергия видимого света. Биологическое значение фотореактивации состоит в том, что организмы, обитающие на поверхности земли, наряду с освещением видимым светом подвергаются вредному воздействию УФ-излучения Солнца и таких стрессов как тепловой шок, иссушение, осмотический стресс. Репарирующие функции фотолиаз могут использоваться в координации с

ответом на стресс, что представляются существенными для выживания таких организмов.

1.8.6. Управляемый стресс и его практическое использование применительно к молочнокислым бактериям

Подход к совершенствованию управляемого культивирования микроорганизмов на основе целенаправленного сочетания стрессорных и антистрессорных воздействий был назван «контролируемым стрессом», «контролируемым оксидативным стрессом [309]. Такой подход к управляемому культивированию микроорганизмов разрабатывается на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева, начиная с 2000-х гг. В качестве одного из вариантов, технологически рациональных и приемлемых для практической реализации, используется контролируемое совместное воздействие оптимальных доз различных активных форм кислорода, в частности H_2O_2 , и видимого света низкой интенсивности.

Рассмотренные выше примеры различных перекрестных реакций между системами ответа на стресс, в том числе оксидативный, а также репарации, включая фоторепарацию, также свидетельствуют в пользу возможного приобретения светочувствительности стрессированных популяций, в нормальном физиологическом состоянии нечувствительных к видимому свету. Таким образом, возникающая светочувствительность при воздействии стрессоров может быть использована для расширения возможностей управляемого культивирования нефототрофных микроорганизмов, в частности, путем комбинирования воздействия стрессорными факторами и светом. Однако до недавнего времени на эту возможность в литературе по управляемому культивированию микроорганизмов практически не обращалось внимания. В этой связи заслуживают внимания данные о положительном действии стресса на отдельные показатели роста и биосинтеза, выживаемости клеток, что может быть использовано на практике [310]. В исследованиях, проведенных на кафедре биотехнологии РХТУ, на примере ряда продуцентов (дрожжей *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica*, бактерий *B. subtilis*, активных илов при очистке модельных и реальных

сточных вод) было показано, что оптимальное сочетание видимого и УФ излучения, время и количество внесения H_2O_2 , и с учетом плотности популяции и преадаптации микроорганизмов к воздействию стрессора повышает выход биомассы и внутриклеточного содержания белка на 10-20%, бродильную активность дрожжей-сахаромицетов на 20-30%, качество очистки сточных вод, скорость гранулообразования консорциумов активного ила в отъемно-доливных режимах биологической очистки [180–184].

Важное практическое применение управления оксидативным стрессом – борьба с ростом посторонней микрофлоры с использованием активных форм кислорода в процессах ферментации [311]. Управляющим фактором в данном случае может быть не только доза АФК, но и видимый свет, на что необходимо обращать внимание для инициирования или избегания фоторепарации, повышающей жизнеспособность микроорганизмов после воздействия АФК [312, 313].

В работе [314] исследовалась выживаемость *L. plantarum* после распылительной сушки при различных видах предварительного стрессирования в условиях комнатной и низкой (4 °С) температур в присутствии и отсутствии света. Выживаемость анализировали перед, сразу после распылительной сушки и в течение 180 дней в разных условиях хранения (комнатная температура и дневной свет, комнатная температура в отсутствии света, температура 4°С и дневной свет). Степень инактивации клеток при этом различалась несущественно. Проведение тех же манипуляций с *P. acidilactici*, показало, что любая предварительная обработка снижает выживаемость культуры, однако наблюдалось заметное уменьшение скорости потери жизнеспособности при воздействии света в сравнении с условиями отсутствия света при комнатной температуре.

Таким образом, контроль количества и качества стресс-факторов, а также избирательное усиление/подавление действия этих факторов на микроорганизмы, может оказаться эффективным средством совершенствования процессов культивирования и интенсификации микробиологического синтеза целевого продукта.

Методы нивелирования стрессовых воздействий могут включать:

- оптимизацию питательной среды;
- отвод продуктов, ингибирующих биосинтез, из зоны ферментации;
- повышение стрессоустойчивости продуцентов;
- использование управляемого стресса – комбинированного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов.

Применительно к использованию, в частности, направленных стрессовых воздействий необходимо учитывать следующие моменты:

1) На популяционном уровне длительное воздействие стрессоров в сублетальных дозах вызывает адаптивные и микроэволюционные изменения. У молочнокислых бактерий преадаптация к сублетальным дозам стрессоров повышает устойчивость клеток бактерий к стрессам.

2) В клетках молочнокислых бактерий выявлен широкий спектр механизмов, генетических и биохимических систем ответа, регуляторных путей, повышающих выживаемость клеток в условиях стресса. Наблюдается определенная общность, консервативность и универсальность в путях регуляции ответа на стресс. Совокупно все они обуславливают различную чувствительность клеток МКБ к стрессорам, контроль транскрипции и посттрансляционной модификации белков, синтез защитных веществ и активацию систем репарации.

3) Имеется тесная биохимическая и генетическая связь между различными системами ответа на стресс, а также между системами репарации при внутриклеточных повреждениях в стрессовых ситуациях. Поэтому часто наблюдается перекрестный ответ на различные виды стресса. Наличие перекрестной адаптации и перекрестных реакций может обеспечить, например, устойчивость клеток в состоянии оксидативного стресса, индуцированного действием H_2O_2 , к тепловому шоку, к повышенным концентрациям субстрата или продукта биосинтеза.

4) В литературе отсутствуют сведения об использовании сочетанного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов для улучшения показателей биосинтеза применительно к молочнокислым бактериям.

5) Описанное в литературе положительное воздействие АФК, в частности H_2O_2 , на дрожжи и другие объекты свидетельствует о возможности целенаправленного использования факторов оксидативного стресса для улучшения выходных показателей культивирования молочнокислых бактерий.

б) У стрессированных культур микроорганизмов, изначально нечувствительных к видимому свету, возможно появление чувствительности к нему, в частности, в популяциях, подвергнутых воздействию активных форм кислорода. Такое появление чувствительности у молочнокислых бактерий, вероятно, обусловлено функционированием фоторепарации. В этом случае видимый свет может стать значимым фактором при проведении ферментационных процессов с использованием МКБ.

б) Применительно к задачам диссертационной работы имеет значение предобработка микробной популяции низкими дозами стрессоров с целью ее преадаптации к более высоким дозам стрессоров, а также наличие перекрестной адаптации к воздействию разных стрессоров.

В связи с этим, апробация различных вариантов воздействия стрессоров представляется целесообразной для разработки инновационных подходов в совершенствовании микробиологического синтеза молочной кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объектом исследования являлся штамм молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* В 4079 из ВКПМ (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика).

Для культивирования МКБ использовали питательную среду Man-Rogosa-Sharpe (MRS, стандартная) следующего состава (г/л): гидролизат казеина – 10, пептон – 10, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 - 2, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ – 5, цитрат триаммония – 2, $MgSO_4$ – 0,2, $MnSO_4$ – 0,05.

Также использовались: питательная среда MRS (модифицированная для проведения экспериментов в ферментере) следующего состава (г/л): глюкоза – 100–110, дрожжевой экстракт – 5–10, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4$ – 0,1, $MnSO_4$ – 0,05;

и питательная среда MRS (модифицированная для экспериментов на колбах) следующего состава (г/л): глюкоза – 20-30, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4$ – 0,1, $MnSO_4$ – 0,05, содержащая дополнительно различные источники азота и ростовых факторов в количестве 5–15 г/л. При культивировании в колбах на среде с концентрацией глюкозы выше 30 г/л в колбы дополнительно вносили мел в количестве 2% от массы среды во избежание закисления последней образующейся молочной кислотой.

Методы культивирования.

Культивирование на твёрдых средах.

Питательная среда разливается по чашкам Петри 5 мм по высоте жидкого слоя. На поверхность затвердевшей среды методом Коха производится засев культуры. Рассевы с жидких сред производятся методом Коха с помощью шпателя Дригальского. Культивирование осуществляют в термостате при 37 °С.

Культивирование на жидких средах.

Культивирование проводили как в колбах объемом 50, 100, 250 мл, так и в биореакторе. Засев культуры с твердой среды производили перенесением отдельной колонии с чашки Петри в колбы с питательной средой. Засев с жидкой

питательной среды производили внесением инокулята в объеме 5-10% от объема среды. Для обеспечения стерильности в процессе культивирования использовали плотные ватно-марлевые пробки, закрывающие горло емкостей. Все иные процедуры с чистыми культурами проводили с обеспечением условий асептики.

В качестве инокулята использовали суточную культуру *Lactobacillus paracasei*, выращенную с использованием стандартной среды MRS. Варианты культивирования в колбах с отличиями от стандартных условий описаны отдельно при изложении результатов экспериментов.

Также культивирование проводили в плоскодонных планшетах в термошейкере PST-60HL-4.

В контролируемых условиях культивирование проводили в лабораторном ферментере Minifors (INFORS, Швейцария) общим объемом 5 л (рис. 11).



А



Б

Рис. 11. Лабораторный ферментер Minifors.

А) Культивирование в условиях освещенности (использовался источник дополнительного освещения, на фото не представлен).

Б) Культивирование в условиях затемнения (ферментер закрывался кожухом из фольги).

Данный аппарат имеет устройства для измерения и регулирования температуры и рН ферментационной среды, датчики для измерения концентрации растворённого кислорода, сигнализаторы уровня пены, приспособления для пеногашения, счетчики количества подаваемых титрующих агентов, а также

резервуары для хранения компонентов питательной среды и насосы для их непрерывной подачи в ферментер.

Рабочий объем среды составлял 3 л. Скорость вращения мешалки – 150,0–200,0 об/мин. В ходе процесса осуществлялась автоматическая подтитровка 25 % раствором аммиака до значений кислотности среды 6,8.

Процесс культивирования контролируется с помощью программного обеспечения Iris V5. Ход регистрации параметров культивирования выводится на монитор (рис. 12).

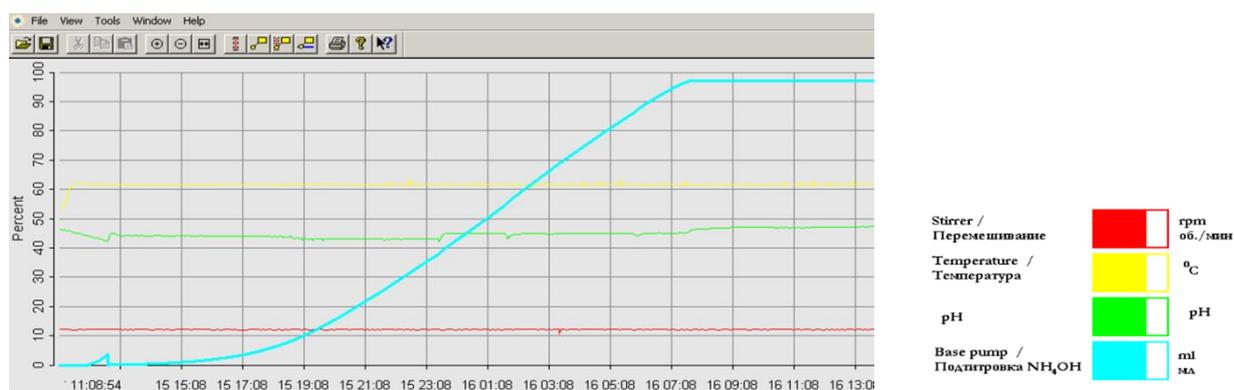


Рис. 12. Параметры, регистрируемые в ходе культивирования бактерий *L. paracasei*.

Воздействие стрессоров

При определении сублетальной концентрации пероксид водорода вносили в культуру, находящуюся в фазе замедленного роста, концентрация субстрата (глюкозы) при этом составляла 10-12% от начальной концентрации. По результатам определения сублетальной концентрации осуществлялся отбор устойчивых к H₂O₂ культур молочнокислых бактерий путем последовательных пассирований в колбах на среде с глюкозой, в которую на конец экспоненциальной фазы вносили H₂O₂ в установленной сублетальной концентрации. Для каждого эксперимента был свой контроль - культура молочнокислых бактерий, куда H₂O₂ не вносился.

Для изучения эффекта перекрестной адаптации культуру, преадаптированную к окислительному стрессу, вызванному внесением в среду пероксида водорода в сублетальных количествах, подвергали тепловому и осмотическому шоку. Сублетальная температура составляла 52 °C, время

экспозиции – 15 минут [191], в качестве агента осмотического шока использовали NaCl, который вносили в ферментационную среду на 7-й час культивирования, концентрация NaCl во всем объеме среды составляла 1М [190].

При пассировании к оксидативному и/или перекрестным стрессам культивирование проводили как с использованием дополнительного освещения на свету, так и без него, причем колбы и ферментер изолировались светопоглощающим материалом (алюминиевой фольгой или плотной темной тканью), с целью изучения возможного влияния фоторепарации на перекрестную адаптацию культуры к стрессовому воздействию. Предполагалось, что фоторепарация как система стресс-ответа может участвовать в преодолении негативного воздействия стрессоров.

Методы анализа.

Физико-химические и микробиологические методы.

Значения pH измерялись pH-метром с использованием стеклянного измерительного и хлорсеребряного электрода сравнения; SevenCompact pH/Ion S220 (Mettler Toledo) и аналогичных марок – с использованием комбинированного электрода.

Уровень освещенности среды измерялся люксметром/УФ-радиометром ТКА–01/3 (г. Санкт-Петербург).

Содержание биомассы молочнокислых бактерий определяли по оптической плотности (турбодимитрически, фотоэлектродиметр КФК-3, $\lambda=540$ нм, $l=3$ мм, или $l=5$ мм); а также непосредственным измерением СВ клеток микроорганизмов с последующим построением калибровочных кривых и пересчетом показаний с единиц оптической плотности на АСБ (1 ед. оптической плотности при длине оптического пути 5 мм и $\lambda=540$ нм соответствует 0,7 г/л асб), а также по колониобразующим единицам. Для определения СВ бактерий суспензию клеток МКБ отфильтровывали и промывали на мембранном фильтре, а затем высушивали при 105 °С до постоянного веса.

При культивировании молочнокислых бактерий в планшетах оптическую плотность измеряли на ИФА-фотометре iMark, BioRad при длине волны 505 нм.

Количество жизнеспособных клеток *Lactobacillus paracasei* (КОЕ/мл) подсчитывали при помощи высева последовательных десятикратных разведений исследуемой суспензии микроорганизмов на агаризованную среду MRS [315]. Микроскопические наблюдения проводили на микроскопе Primo Star «Carl Zeiss» при увеличении 10*40 и 10*100 с иммерсией.

Химические и биохимические методы.

Концентрацию глюкозы определяли эбулиостатическим методом [316], содержание молочной кислоты в культуральной жидкости определяли потенциометрическим титрованием в изопропаноле 1%-ным раствором NaOH, а также с помощью ВЭЖХ (использовали изократическую ВЭЖХ систему серии 1220 Infinity, колонка ZORBAX Eclipse Plus-C18 (4.6×12.5 мм) марки Agilent). Калибровка велась по растворам молочной (концентрации 80 г/л, 16 г/л, 8 г/л, 4 г/л) и уксусной (концентрации 100 г/л, 20 г/л, 10 г/л, 5 г/л) кислот. Для подтверждения пиков применялся метод ввода эталона (молочной и уксусной кислот) в пробу. О концентрации биомассы судили по оптической плотности, которую измеряли при толщине кюветы 1 см, длине волны 505 нм, ФЭК «Экотест 2020».

Массовую долю содержания сырого протеина в источниках ростовых факторов определяли методом Кьельдаля согласно ГОСТ 32044.1-2012, определение аминного азота осуществляли при помощи формольного титрования (ОФС.1.2.3.0022.15). Массовую долю содержания аминного азота в сыром протеине определяли следующим образом:

$$\frac{AA}{СП, \%} = \frac{AA \times 6,25}{СП \times Н}, \text{ где}$$

AA - содержание аминного азота, мг %;

СП - содержание сырого протеина, масс. д.

Н - масса навески вещества, взятая для анализа, г

Концентрацию H_2O_2 определяли спектрофотометрически – на УФ-спектрофотометре с кварцевой кюветой при длине волны 240 нм, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [317, 318].

УФ-спектры снимали следующим образом: пробы, отобранные в процессе культивирования, центрифугировали 10 мин на скорости 9000 об/мин, разбавляли

в 100 раз, после чего помещали их в кварцевую кювету и снимали УФ-спектры, в качестве раствора сравнения (контроля) использовали как дистиллированную воду, так и разбавленную в 100 раз среду MRS.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программ MS Excel и STATISTICA. Планирование экспериментов и обработка полученных результатов проводились в соответствии по рекомендациям, представленным в [172]. Для определения значимости коэффициентов уравнения регрессии 1 порядка дополнительно проводили n параллельных измерений в центре плана, на основании которых определяли стандартное отклонение или дисперсию воспроизводимости:

$$S_{\text{воспр}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n - 1}$$

Ошибку j -го коэффициента уравнения при количестве опытов N определяли в соответствии с уравнением:

$$S_{b_j}^2 = \frac{S_{\text{воспр}}^2}{\sum_{i=1}^N X_{ji}^2}$$

Значимость каждого коэффициента определялась с использованием соотношения:

$$\frac{|b_j|}{s_{b_j}} = t_j < t_p(f), \text{ при этом учитывалось табличное значение коэффициента}$$

Стьюдента. Адекватность полученной модели оценивалась при помощи критерия Фишера по формуле:

$$\frac{S_{\text{ад}}^2}{S_{\text{воспр}}^2} = F < F_{1-P}(f_{\text{ад}}, f_{\text{воспр}})$$

Пробы, отобранные в ходе различных вариантов культивирования, подвергались лизису согласно [319]. Содержание белка в лизатах определяли методом Лоури [320], для построения калибровочных кривых использовали бычий сывороточный альбумин. Расчёт содержания белка в лизатах (P , мг/л) проводили по формуле:

$$P = c * N,$$

где c – концентрация белка в лизатах, определенная с использованием калибровочных кривых, мг/л;

N – необходимое разведение раствора.

Качественный состав белков в лизатах клеток МКБ оценивали при помощи SDS-PAAG электрофореза по Лэммли. Концентрирующий гель (4%) готовили с использованием 0,5М Трис-НСl буфера (рН 6,8) концентрация SDS составляла 0,1%, разделяющий (12%) – на 1,5М Трис-НСl (рН 8,8). При приготовлении буфера для нанесения использовали: SDS – 1%, глицерин – 10%, β -меркаптоэтанол – 2,5%. Гель загружался в вертикальную камеру VE-1M (Хеликон), используемый источник - постоянного тока «Эльф», напряжение составляло 50 В (прохождение проб концентрирующего геля) и 100 В (прохождение проб разделяющего геля). Для избежания размывания полос белки в геле фиксировали 15% трихлоруксусной кислотой, после чего окрашивали, используя Coomassie Blue G250.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева проводились работы по усовершенствованию процесса получения молочной кислоты при использовании молочнокислых бактерий в мембранном биореакторе за счет сохранения физиологической активности культур микроорганизмов в процессе длительного высокоплотного культивирования. Выбор подходящего микроорганизма обуславливался задачами работы и основывался на способности штамма максимально полно использовать субстрат, накапливать существенные количества продукта с высокой скоростью, быть устойчивым к высоким концентрациям молочной кислоты.

Для исследований из ВКПМ (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика) были отобраны следующие штаммы молочнокислых бактерий, осуществляющие гомоферментативное брожение: *Lactobacillus plantarum* В 4174, *Lactobacillus acidophilus* В 4098, *Lactobacillus sp.* Y 12 В 6242, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 12 В 4079, Штамм *Lactobacillus casei* М-76 В 3489, *Lactococcus lactis subsp. lactis* В 3123, *Lactococcus lactis subsp. lactis* В 4236.

На основании проведенных исследований по подбору штаммов молочнокислых бактерий при использовании таких критериев как продуктивность, выход молочной кислоты, а также степень потребления углеводов при культивировании на средах с различными источниками углерода было установлено, что наилучшими совокупными характеристиками обладает штамм *Lactobacillus paracasei*. В связи с этим дальнейшая отработка различных процессов культивирования проводилась с данным штаммом.

3.1. Выбор оптимальных параметров состава питательной среды

3.1.1. Исследование влияния источника углерода на биосинтетическую активность выбранного штамма МКБ

Объектом исследования был выбран штамм МКБ *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* В 4079, отобранный ранее на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева из коллекционных штаммов ВКПМ (НИЦ «Курчатовский институт» –

ГосНИИгенетика), как наиболее устойчивый к высоким концентрациям молочной кислоты и наиболее продуктивный (не менее чем в 2 раза превосходит остальные штаммы). На первом этапе проводили исследования по влиянию основного компонента среды на биологическую активность выбранного штамма МКБ. Состав среды должен быть наиболее экономически выгодным и не приводить к ухудшению ранее полученных показателей для выбранного штамма: степень потребления углеводов – 97,5 %, выход продукта – 92 – 95 %, продуктивность – не менее 1,5 г/л*ч.

Технология получения молочной кислоты при использовании в качестве источника углерода чистой глюкозы существенно дорожает. Поэтому проводили исследования способности *L. paracasei* сбраживать не только глюкозу, но и другие источники углеводов.

Культивирование проводили в лабораторном ферментере Minifors. Рабочий объем среды составлял от 2 до 4 л. Скорость вращения мешалки – 150,0 об/мин. В ходе процесса осуществлялась автоматическая подтитровка 25 % раствором аммиака до значений кислотности среды 6,0-6,5. Количество вносимого инокулята составляло 10,0 %.

Культивирование проводилось на питательной среде следующего состава:

Источник углерода – в каждом эксперименте использовался свой (глюкоза, сахароза, непродобработанная меласса),

Дрожжевой экстракт – 10 г/л,

K_2HPO_4 – 2,5 г/л,

$MgSO_4$ – 2 г/л,

$MnSO_4$ – 0,02 г/л.

А) Культивирование L. paracasei при использовании в качестве источника углерода глюкозы.

Результаты культивирования *L. paracasei* на глюкозе представлены в табл. 2. Продолжительность культивирования составила 21 час, длительность лаг-фазы – 5 час, средняя скорость потребления углеводов, в данном случае близкая к продуктивности биореактора по молочной кислоте – 4,6 г/л*ч, выход молочной

кислоты – 99 %, степень потребления углеводов – 97 %. Исходная концентрация глюкозы – 100 г/л; оптическая плотность биомассы в инокуляте – 0,217 ОЕ, в конце основной ферментации – 2,335 ОЕ.

Б) Культивирование L. paracasei на питательной среде, содержащей сахарозу.

Для данной ферментации инокулят был приготовлен также на сахарозе с концентрацией 50 г/л.

Результаты культивирования *L. paracasei* на сахарозе представлены в табл. 2. В данном случае максимальная оптическая плотность в конце основной ферментации составила 4,47 опт. ед. Выход по молочной кислоте не превысил 71 % от теоретически возможного. Степень потребления углеводов – 91,8 %. Средняя скорость потребления углеводов в процессе молочнокислого брожения составила 2,3 г/л*ч.

Полученные данные согласуются с данными ранее проведенных колбочных экспериментов и свидетельствуют о существенно более низкой скорости конверсии сахарозы данным штаммом по сравнению с конверсией глюкозы. Низкая скорость конверсии сахарозы обусловлена, по-видимому, низкой активностью сахаразы, расщепляющей сахарозу на глюкозу и фруктозу, вовлекаемых затем в гликолиз.

В) Культивирование L. paracasei на питательной среде, содержащей мелассу.

В третьем варианте культивирования в качестве источника углерода использовалась меласса. После стерилизации среды и внесения инокулята начальное содержание сахаров в питательной среде составило 120 г/л.

Данные по ферментации представлены в табл. 1, табл. 2 и на рис.13.

Длительность лаг-фазы при культивировании *L. paracasei* на среде с мелассой в качестве источника углерода составила 2 часа. Как видно из рис. 14 в течение 38 часов наблюдается наиболее интенсивный рост биомассы. Параллельно с этим осуществляется потребление сахаров, незначительно увеличиваясь по ходу культивирования (с ростом оптической плотности культуры) до 30-го – 38-го часа. Затем скорость роста культуры начинает снижаться, и к 71-му часу культивирования концентрация биомассы составляет 6,6 опт. ед. Средняя скорость потребления углеводов в процессе молочнокислого брожения составила 1 г/л*ч.

Таблица 1.

Культивирование *Lactobacillus paracasei* на питательной среде, содержащей мелассу.

Время, ч	Оптическая плотность ($\lambda=505$ нм)	Концентрация углеводов (сахароза), г/л	Концентрация молочной кислоты, г/л	Скорость потребления сахаров, г/л*ч	Выход МК, %
0	0,155	120	-		
15	2,37	105	-	1	
18	3,36	101,5	-	1,2	
24	3,65	91,5		1,7	
38	4,75	74,5		1,2	
49	5,45	65,7		0,8	
63	6,26	55,4		0,7	
71,3	6,6	49,5	71,3	0,6	
Средняя величина:				1,0	96,1

Выход молочной кислоты составил 96,1 % от теоретически возможного (по сахарозе), что свидетельствует о высокой степени конверсии сахаров свекловичной мелассы.

В целом, ростовые характеристики *L. paracasei* при проведении культивирования с использованием питательной среды, содержащей свекловичную мелассу, также значительно хуже по сравнению с культивированием на питательной среде, содержащей глюкозу: длительность культивирования возрастает до 116,5 час (т.е. в 5,5 раз); средняя скорость потребления углеводов снижается с 4,6 до 1,0 г/л*ч, а удельная активность биомассы – с 1,74 до 0,12 г/(опт. ед.*ч), т.е. приблизительно в 14 раз.

В следующем эксперименте культивирование вели с использованием в качестве углеводного субстрата смеси мелассы и глюкозы (углеводы мелассы – 80 г/л, глюкоза – 20 г/л).

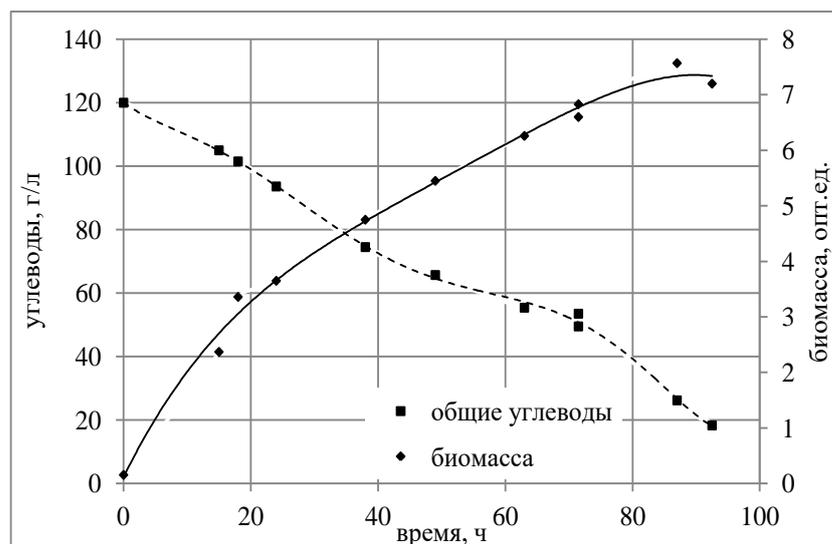


Рис. 14. Кривые роста и потребления углеводов штаммом *L. paracasei* в процессе ферментации на среде, содержащей свекловичную мелассу.

В данном случае на 26-ом часу эксперимента был произведен отбор ферментационной среды и долив свежей питательной среды того же состава, что и исходная (соотношения мелассы и глюкозы те же. Инокулят выращивался на среде состава основной ферментации в течение 14 час.

В этом случае длительность лаг-фазы составила приблизительно 2 часа. На первом этапе культивирования не наблюдалось значительного увеличения скорости потребления субстрата – средняя скорость потребления углеводов составила 0,54 г/л*ч. Кроме того, на кривой титрования заметна диауксия – результат остановки процесса брожения из-за перехода с одного субстрата на другой (рис. 15). При этом видно, что скорость сбраживания глюкозы гораздо выше. Это указывает на то, что глюкоза, как более простой субстрат, потребляется в первую очередь в течение 6,5 час.

В табл. 2 сопоставлены показатели культивирования *L. paracasei* на различных субстратах.

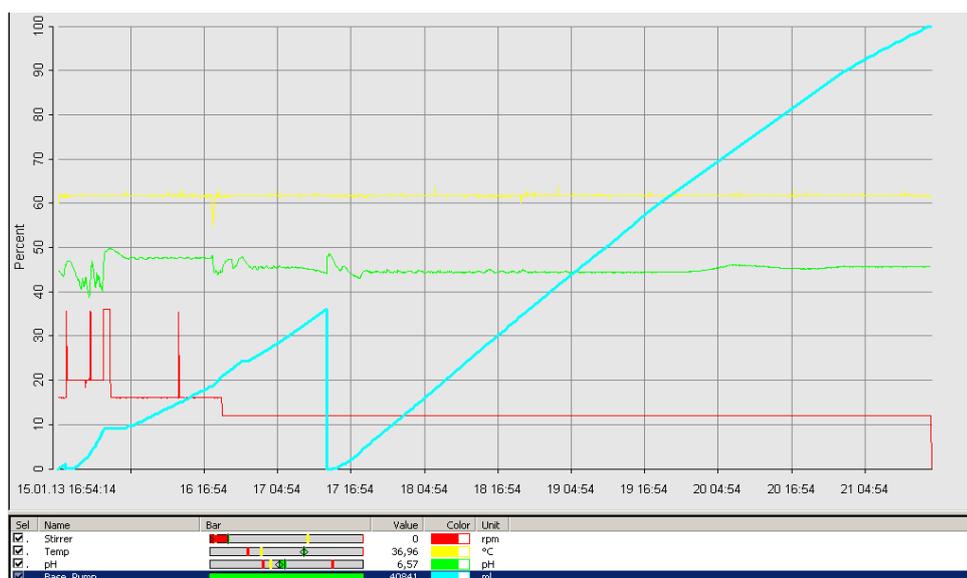


Рис. 15. Параметры, регистрируемые в ходе культивирования бактерий *L. paracasei* на питательной среде, содержащей свекловичную мелассу и глюкозу.

Таблица 2.

Показатели культивирования молочнокислых бактерий *L. paracasei* на средах с углеводными субстратами.

Показатели периодического процесса культивирования	<i>Свекловичная меласса</i>	<i>Сахароза</i>	<i>Глюкоза</i>
Продолжительность, ч	116,5	74,5	21,0
Длительность лаг-фазы, ч	2,0	2,0	5,0
Средняя скорость потребления углеводов, г/л*ч	1,0	2,3	4,6
Максимальная скорость потребления углеводов в экспоненциальной фазе роста, г/л*ч	1,7	3,8	8,8
Максимальное накопление биомассы, г/л	6,4	4,47	5,9
Степень потребления углеводов, %	93,0	91,8	97,1
Выход молочной кислоты, %	94,6	71,0	98,0

Таким образом, полученные результаты показали, что при культивировании штамма *L. paracasei* B4079 на сахарозе и свекловичной мелассе последние

сбраживаются с существенно меньшей скоростью по сравнению с глюкозой, что ограничивает использование сахарозу-содержащих субстратов для получения молочной кислоты и обуславливает необходимость поиска других решений для совершенствования процесса культивирования.

3.1.2. Культивирование с предобработанной мелассой

Так как процесс ассимиляции мелассы штаммом *L. paracasei* В 4079 может быть лимитирован активностью ферментов сахаразы/инвертазы, то было целесообразно изучить возможность интенсификации процесса сбраживания путем кислотной предобработки мелассы, в результате которой сахароза инвертируется в глюкозу и фруктозу.

Состав исходной используемой мелассы приведен в табл. 3.

Таблица 3

Состав мелассы.

СВ, %	pH	Общие сахара, %	Сахара, % от СВ	РВ, % от ОС	СаО, % от СВ
77,2	6,85	51,1	66,2	2,6	0,86

Как и в предыдущих экспериментах культивирование проводили в лабораторном ферментере Minifors.

Состав питательной среды:

Свекловичная меласса – 100 г/л (по редуцирующим веществам),

Дрожжевой экстракт – 10 г/л.

Минеральные компоненты питания (соли калия и магния, фосфаты) не вносились.

Предобработка образцов мелассы (химический гидролиз) осуществлялась 0,2 М раствором серной кислоты при 0,5 ати и температуре 115 °С в течение 40 мин. Содержание мелассы в растворе, приготовленном для гидролиза, варьировалось таким образом, чтобы концентрация углеводов после полного гидролиза сахарозы составляла 200 г/л по РВ. После гидролиза раствор отфильтровывали при помощи бумажного фильтра. Затем гидролизат нейтрализовали аммиаком до значений pH

4,8-5,5. Расход 25% раствора аммиака составил приблизительно 44,5 мл на 1500 мл гидролизата. Нейтрализованный гидролизат стерилизовали повторно в течение 15 мин при 0,5 ати ($T = 115\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Культивирование осуществляли при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH поддерживали на уровне 6,5-6,6, скорость перемешивания составляла 200 об/мин.

Основные показатели культивирования представлены в табл. 4. В этом случае длительность лаг-фазы составила приблизительно 6 час.

Средняя скорость потребления углеводов составила $4,7\text{ г/л*ч}$. Степень потребления углеводов – 96,2%. Средняя удельная активность биомассы – $1,1\text{ г/(опт. ед.*ч)}$. Эти показатели близки к таковым при росте штамма *L. paracasei* В4079 на глюкозе.

Таблица 4.

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, ч	20,5
Конечная концентрация биомассы, опт. ед.	4,2
Концентрация молочной кислоты, г/л	117,0
Средняя скорость потребления углеводов, г/л*ч	4,7
Удельная продуктивность, г/(опт. ед.*ч)	1,1
Конечная концентрация углеводов, г/л	3,8
Степень потребления углеводов, %	96,2
Выход МК, %	95,0

Таким образом, предварительный гидролиз мелассы позволяет увеличить скорость брожения не менее чем в 2 раза по сравнению с негидролизованной мелассой. Предобработанную кислотным гидролизом мелассу можно использовать в качестве субстрата для получения молочной кислоты без значительного

снижения основных показателей ферментации и без внесения минеральных компонентов питания (солей калия и магния, фосфатов). Отсутствие диауксии в потреблении углеводов после гидролиза сахарозы/мелассы свидетельствует, что фруктоза, образующаяся наряду с глюкозой после гидролиза, потребляется с не меньшей эффективностью по сравнению с глюкозой.

3.1.3. Подбор источника азота и факторов роста для получения молочной кислоты при культивировании *L. paracasei*

Одной из задач исследования являлась замена дрожжевого экстракта на другой источник азота и факторов роста, поэтому на следующем этапе работы проводилось изучение роста бактерий *L. paracasei* В 4079 и синтеза молочной кислоты на средах, содержащих гидролизаты азотсодержащего сырья различной природы вместо стандартного дрожжевого экстракта.

В табл. 5 приведены некоторые характеристики гидролизатов, выбранных в качестве замены дрожжевому экстракту. Источники ростовых факторов были любезно предоставлены сотрудниками кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева Хабибулиной Н.В. и Вакар Л.Л.

Культивирование микроорганизмов проводили в 250 мл колбах Эрленмейера с объемом питательной среды 150 мл и термостатировали при 37°C. Использовали модифицированную питательную среду MRS с содержанием 20 г/л глюкозы и 5 г/л источников азота и ростовых факторов.

При использовании гидролизатов масса дрожжевого экстракта в питательной среде заменялась на аналогичную массу альтернативных источников азота.

Таблица 5.

Основные характеристики используемых источников азота и факторов роста.

№	Источник азота и ростовых факторов	Содержание сырого протеина, %	Содержание аминного азота, мг %	AA / СП, %
1	Дрожжевой экстракт	62,3	264,6	50,1
2	Гидролизат соевой текстурированной муки	45,4	75,6	20,4

3	Гидролизат концентрата соевого белка	41,3	99,4	26,4
4	Куриный пептон	49,1	184,8	47,1
5	Частично гидролизованные лиофилизированные кормовые дрожжи	58,2	119,0	23,7
6	Пептон из рыбьей чешуи	80,1	54,6	8,2
7	Соевый пептид	53,6	107,8	25,7
8	Дегидрированный соевый соус	13,9	53,2	45,1
9	Соевый олигопептид	53,6	82,6	18,9
10	Кукурузный пептид	52,6	152,6	34,9
11	Гидролизат концентрата белка, полученного из обезвоженной соевой муки методом спиртовой промывки	42,8	81,2	22,4
12	Гидролизат олигопептидов сои	13,3	98,0	82,0

*) АА / СП, % - соотношение аминного азота к сырому протеину.

На рис. 16. 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.

В табл. 6. приведены 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 (рис.16 и табл.6). Существенной разницы в скорости накопления биомассы также не наблюдалось по сравнению с культивированием при использовании дрожжевого экстракта (рис.16). Выход продукта 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. При использовании остальных источников азота и ростовых факторов, перечисленных в табл. 5, также наблюдалось существенное ухудшение показателей биосинтеза (табл. 6).

На рис. 17 приведены сравнительные хроматограммы образцов полученной культуральной жидкости штамма *L. paracasei* В4079 при использовании в качестве источника азота дрожжевого экстракта, гидролизата соевой текстурированной муки и гидролизата соевого белкового концентрата.

Следует отметить, что при использовании соевых источников ростовых факторов 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.

Таким образом, для реализации процесса крупнотоннажного получения молочной кислоты перспективными источниками органического азота и факторов роста являются гидролизат соевой текстурированной муки и гидролизат концентрата соевого белка.

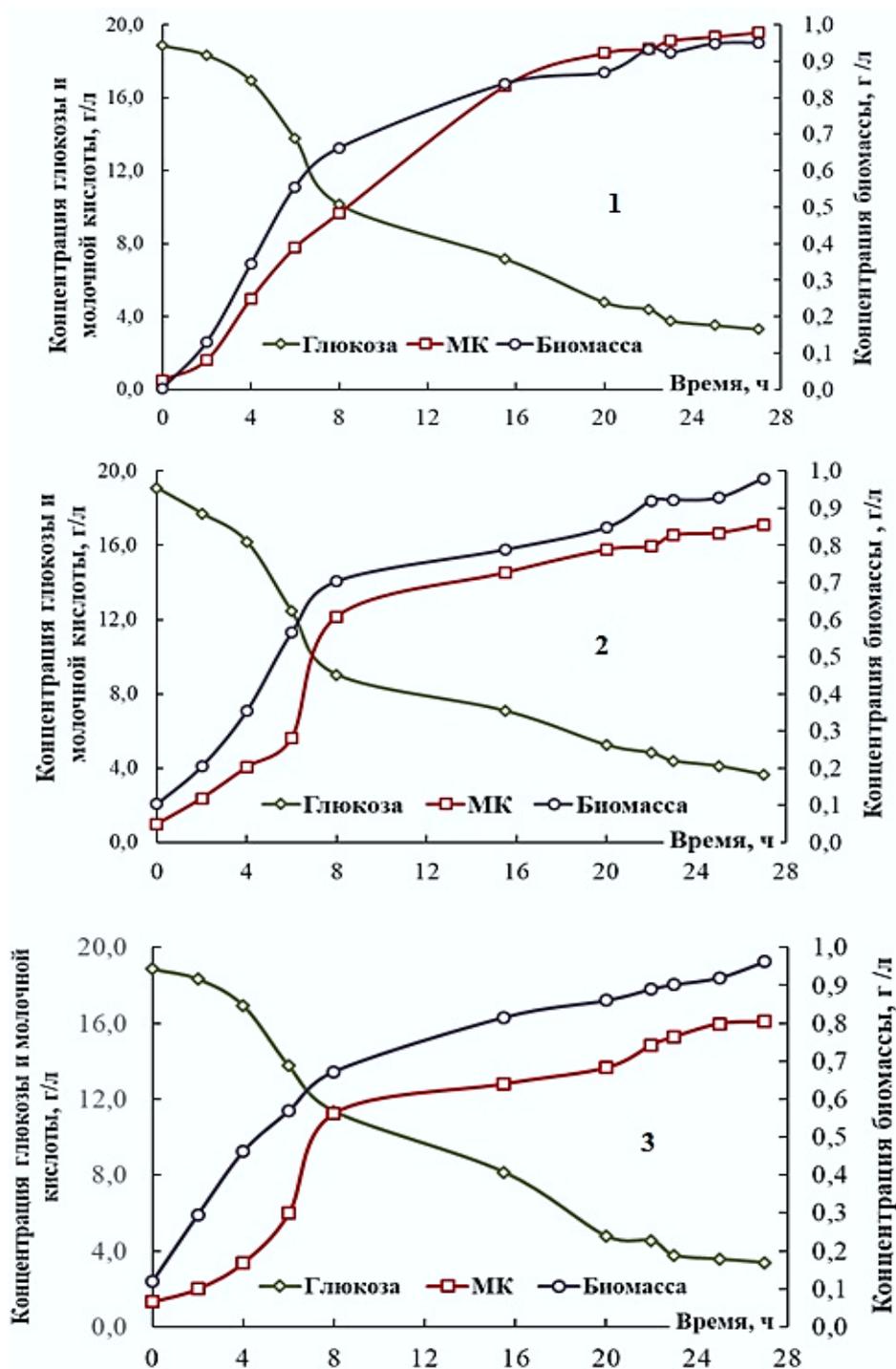


Рис. 16. Культивирование *L. paracasei* В 4079 на средах, содержащих дрожжевой экстракт (1), гидролизат соевой текстурированной муки (2), гидролизат концентрата соевого белка (3).

Таблица 6.

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

Источник, № Показатель	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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}	$1,4 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$
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

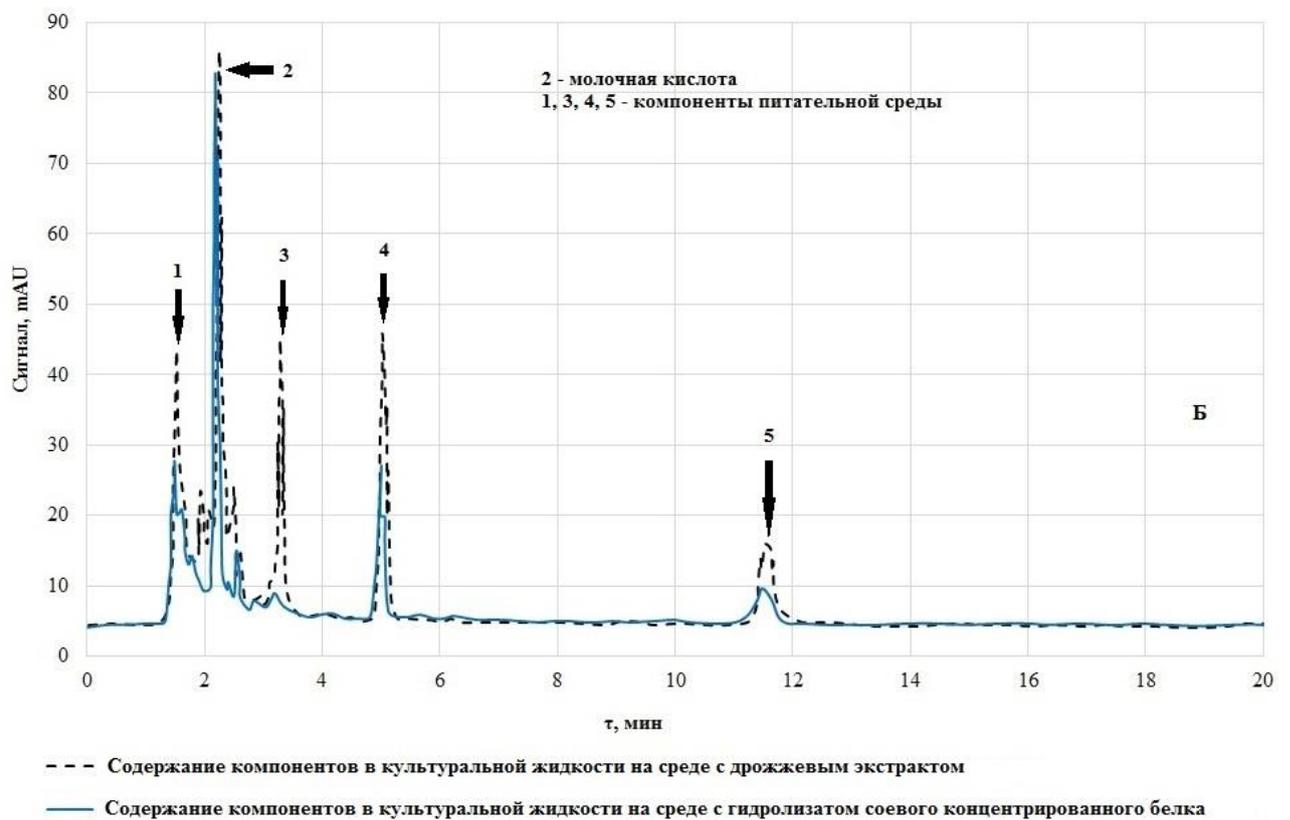
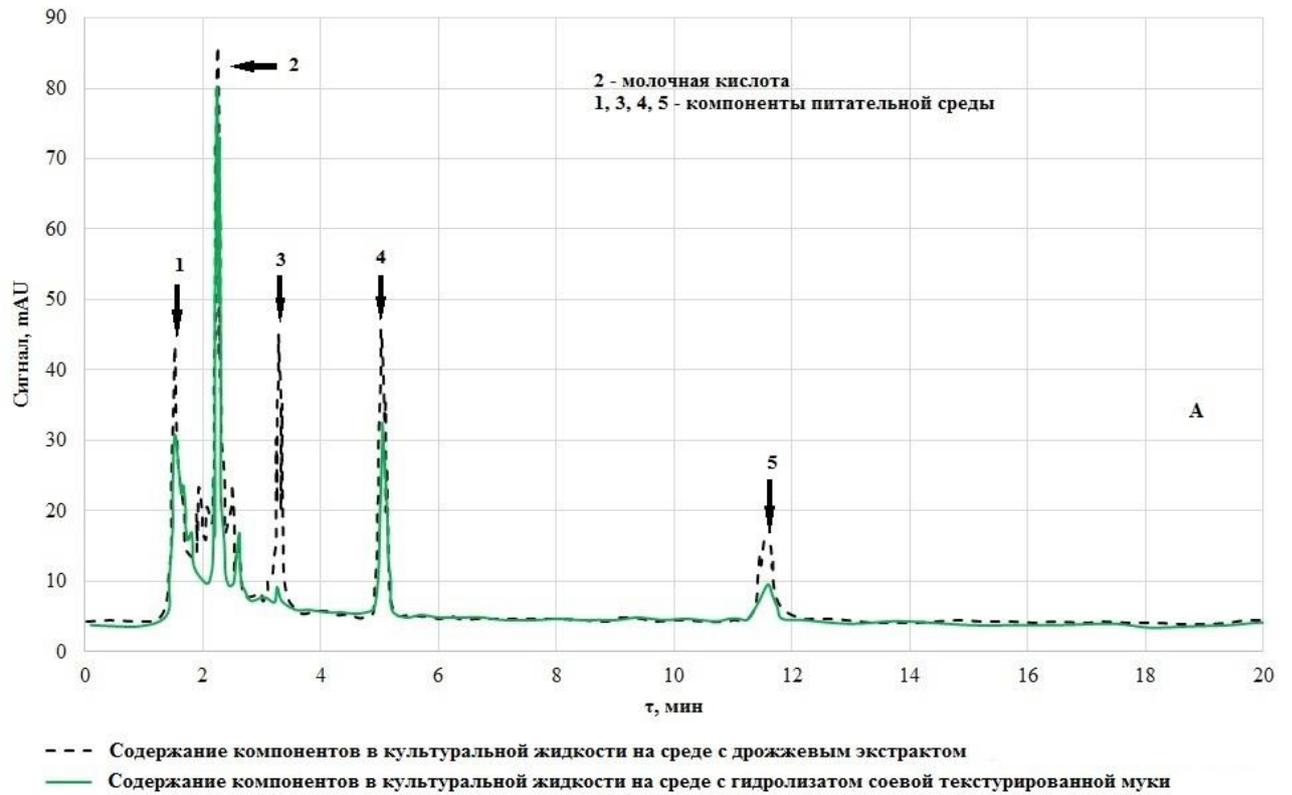


Рис.17. Сравнительные хроматограммы образцов культуральной жидкости *L. paracasei* при использовании различных источников ростовых факторов.

Полученные результаты обуславливают возможность использования более дешевых соевых гидролизатов в технологии получения молочной кислоты при помощи бактерий *Lactobacillus paracasei* В 4079, что может позволить при несколько худших технологических показателях биосинтеза обеспечить конкурентное преимущество с точки зрения качества получаемой молочной кислоты и себестоимости продукта.

3.1.4. Оптимизация количества компонентов питательной среды с использованием полного факторного эксперимента

Третий вариант совершенствования процесса, рассмотренный в представленной работе, был связан с оптимизацией питательной среды по показателям уровня накопления и выхода молочной кислоты. Проводили оптимизацию модифицированной питательной среды MRS, спланированной по схеме полного факторного эксперимента (ПФЭ).

В ПФЭ для выбранного числа уровней составляют матрицу для всех возможных при данном количестве уровней комбинаций факторов. Варьируемыми факторами являлись концентрации компонентов питательной среды: глюкозы, источника азота, фосфатов, солей марганца и магния. При двухуровневом варьировании число проводимых опытов N составило 32.

$$N = n^k, \text{ где}$$

N – число опытов

n – количество уровней варьирования факторов

k – число варьируемых факторов

Для получения данных, используемых при определении эффективности состава питательной среды, проводили культивирование *L. paracasei* В 4079 в течение 28 час в колбах Эрленмейера при 37°C с объемом питательной среды 150 мл.

Варьируемые факторы нормировали при помощи следующего линейного преобразования:

$$x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j}, \text{ где}$$

x_j – нормированное значение фактора;

z_j – значение фактора в натуральном масштабе;

z_j^0 – координаты центра плана;

Δz_j – интервал варьирования по оси j .

$$z_j^0 = \frac{z_j^{\min} + z_j^{\max}}{2}$$

$$\Delta z_j = \frac{z_j^{\max} - z_j^{\min}}{2}$$

Концентрации компонентов питательной среды при проведении полного факторного эксперимента (ПФЭ) варьировались следующим образом:

X_1 – концентрация глюкозы – (10 – 30) г/л,

X_2 – концентрация источника факторов роста – гидролизата соевой текстурированной муки – (5 – 15) г/л,

X_3 – K_2HPO_4 – (1 – 3) г/л,

X_4 – $MgSO_4$ – (0,075 – 0,125) г/л,

X_5 – $MnSO_4$ – (0,025 – 0,075) г/л

На основании данных формул составили матрицу планирования, которую расширили для определения коэффициентов уравнения регрессии.

При наличии параллельных опытов определяют дисперсию воспроизводимости, значимость коэффициентов, используя критерий Стьюдента, а также, при использовании критерия Фишера, адекватность полученного регрессионного уравнения. Расчет данных величин проводился по следующим формулам:

$$S_y^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}$$

$$t_j = \frac{|b_j|}{S_{b_j}} > t_{1-p}(f)$$

$$S_{b_j} = \frac{S_{\text{воспр}}}{\sqrt{N}}$$

$$S_{\text{ост}} = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - l}$$

$$F = \frac{S_{\text{ост}}^2}{S_{\text{воспр}}^2} \leq F_{\text{таб}}$$

Таблица 7.

Показатели адекватности регрессионного уравнения.

Параметр	N	l	S_y^2	S_{b_j}	$t_{0.05}(2)$	$S_{\text{ост}}^2$	F	$F_{\text{таб}}$
Значение	32	14	1,563	0,903	4,3	27.12	17,35	19,4

Таблица 8.

Параметры и показатели культивирования *L. paracasei* в ходе проведения оптимизации состава питательной среды.

№	Начальное содержание углеводов, г/л	Продолжительность культивирования, ч	Концентрация б/м, г/л	КОЕ/мл	Остаточное содержание углеводов, г/л	Степень потребления углеводов, %	Концентрация молочной кислоты	Выход продукта, %	Конверсия, %
1	10	28	1,38	$2,1 \times 10^{10}$	1,00	90	7,43	74,25	74,25
2	10	28	1,42	8×10^{11}	1,00	90	8,10	81,00	81,00
3	10	28	1,55	6×10^9	1,00	90	7,43	74,25	74,25
4	10	28	1,42	$1,3 \times 10^{10}$	1,00	90	7,65	76,50	76,50
5	10	28	1,53	$2,3 \times 10^{10}$	1,00	90	7,43	74,25	74,25
6	10	28	1,48	$3,8 \times 10^{11}$	1,00	90	7,65	76,50	76,50
7	10	28	1,32	$8,1 \times 10^{10}$	1,00	90	8,10	81,00	81,00
8	10	28	1,53	$2,1 \times 10^{10}$	1,00	90	8,10	81,00	81,00

9	10	28	1,54	$3,3 \times 10^{11}$	1,00	90	9,45	94,50	94,50
10	10	28	1,30	$4,4 \times 10^{10}$	1,00	90	9,45	94,50	94,50
11	10	28	1,27	$1,3 \times 10^{10}$	1,00	90	8,55	85,50	85,50
12	10	28	1,30	$2,7 \times 10^{11}$	1,00	90	9,23	92,25	92,25
13	10	28	1,51	$2,5 \times 10^8$	1,00	90	9,68	96,75	96,75
14	10	28	1,25	$2,7 \times 10^9$	1,00	90	9,45	94,50	94,50
15	10	28	1,29	$2,1 \times 10^{10}$	1,00	90	9,90	99,00	99,00
16	10	28	1,30	$1,75 \times 10^{10}$	1,00	90	9,23	92,25	92,25
17	30	28	0,98	$1,9 \times 10^8$	18,83	37	5,40	18,00	48,34
18	30	28	1,16	$1,6 \times 10^9$	18,35	39	6,53	21,75	56,01
19	30	28	0,92	$8,5 \times 10^9$	18,23	39	5,40	18,00	45,88
20	30	28	1,10	$1,6 \times 10^{10}$	19,46	35	7,20	24,00	68,31
21	30	28	1,36	$6,3 \times 10^{11}$	16,29	46	12,15	40,50	88,62
22	30	28	1,37	$3,8 \times 10^9$	12,61	58	13,05	43,50	75,04
23	30	28	1,27	$8,3 \times 10^7$	14,50	52	11,48	38,25	74,03
24	30	28	1,40	$5,2 \times 10^{11}$	13,36	55	13,50	45,00	81,13
25	30	28	0,87	$5,4 \times 10^{10}$	17,98	40	9,00	30,00	74,88
26	30	28	0,43	$4,3 \times 10^{11}$	19,63	35	8,78	29,25	84,62
27	30	28	0,94	$5,4 \times 10^{11}$	17,30	42	10,13	33,75	79,72
28	30	28	0,92	$4,3 \times 10^{11}$	16,75	44	9,00	30,00	67,92
29	30	28	0,18	$6,8 \times 10^{11}$	17,68	41	12,04	40,13	97,71
30	30	28	0,56	$1,5 \times 10^{10}$	21,48	28	8,78	29,25	102,99
31	30	28	0,86	1×10^{11}	17,11	43	11,48	38,25	89,02
32	30	28	1,09	$4,5 \times 10^{11}$	16,00	47	11,93	39,75	85,18

На основании данных, полученных при культивировании, была построена модель, функцией отклика в которой является конверсия субстрата. Далее проводили исключение незначимых коэффициентов с использованием критерия Стьюдента на основании трех параллельных опытов по культивированию молочнокислых бактерий в центре плана, после чего уравнение приняло вид:

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

Также были подтверждены данные литературы [321] о существенном влиянии концентрации ионов Mn^{2+} на конверсию субстрата и, следовательно, выход продукта наряду с концентрацией глюкозы (основной субстрат) и источником ростовых факторов.

Таблица 9.

Матрица ПФЭ потребления субстрата.

№	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₁ X ₃	X ₁ X ₄	X ₂ X ₄	X ₂ X ₅	X ₃ X ₅	X ₄ X ₅	X ₁ X ₂ X ₃	X ₂ X ₃ X ₅	X ₁ X ₂ X ₃ X ₅	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅	Y	Y _{расч}
1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	74,25	71,92
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	81	78,62
3	+1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	74,25	74,96
4	+1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	76,5	81,67
5	+1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	74,25	74,48
6	+1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	76,5	76,49
7	+1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	81	77,53
8	+1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	81	79,54
9	+1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	94,5	91,36
10	+1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	94,5	95,60
11	+1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	85,5	87,19
12	+1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	92,25	91,43
13	+1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	96,75	101,37
14	+1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	94,5	96,41
15	+1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	99	97,20
16	+1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	92,25	92,24
17	+1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	48,34	49,90
18	+1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	56,01	62,75
19	+1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	45,88	48,88
20	+1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	68,31	61,72
21	+1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	88,62	81,99
22	+1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	75,04	77,86
23	+1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	74,03	80,97
24	+1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	81,13	76,84
25	+1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	74,88	80,67
26	+1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	84,62	78,78
27	+1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	79,72	72,44
28	+1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	67,92	70,54
29	+1	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	97,71	97,54
30	+1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	102,99	98,72
31	+1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	89,02	89,31
32	+1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	85,18	90,49

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

Используя полученные поверхности отклика (рис.18), 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.

Установленный состав питательной среды использовался в последующих экспериментах в ферментере. На рис.19. приведены типичные кривые накопления биомассы, молочной кислоты и потребления глюкозы при культивировании *L. paracasei* В4079 на оптимизированной среде в биореакторе. В контролируемых условиях в периодическом режиме культивирования на данной среде, но с исходным содержанием глюкозы около 100 г/л, за 22 час также накапливается также около 100 г/л МК.

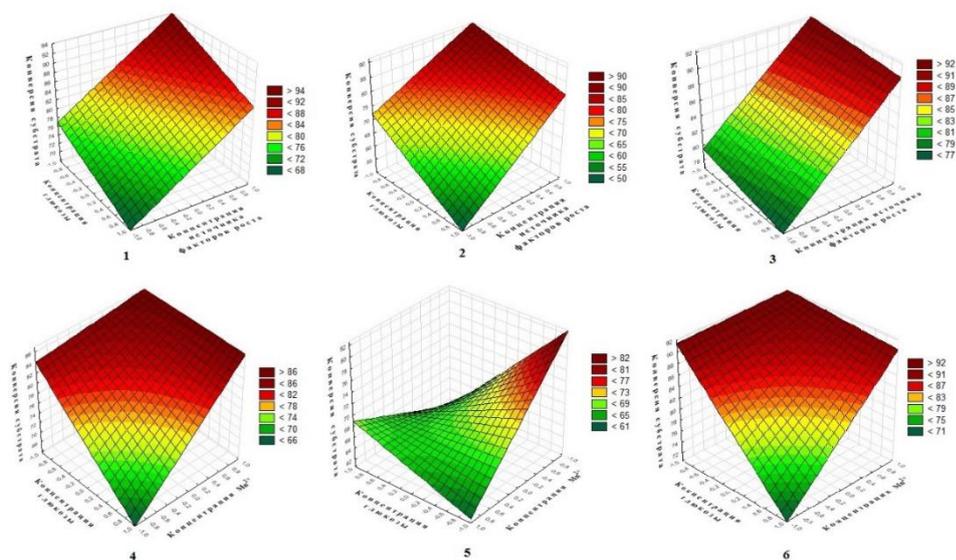


Рис. 18. Полученные поверхности отклика.

1. X_1, X_2 – переменные, $X_3, X_4, X_5 = \text{const} = 0$
2. X_1, X_2 – переменные, $X_3, X_4, X_5 = \text{const} = -1$
3. X_1, X_2 – переменные, $X_3, X_4, X_5 = \text{const} = 1$
4. X_1, X_3 – переменные, $X_2, X_4, X_5 = \text{const} = 0$
5. X_1, X_3 – переменные, $X_2, X_4, X_5 = \text{const} = -1$
6. X_1, X_3 – переменные, $X_2, X_4, X_5 = \text{const} = 1$

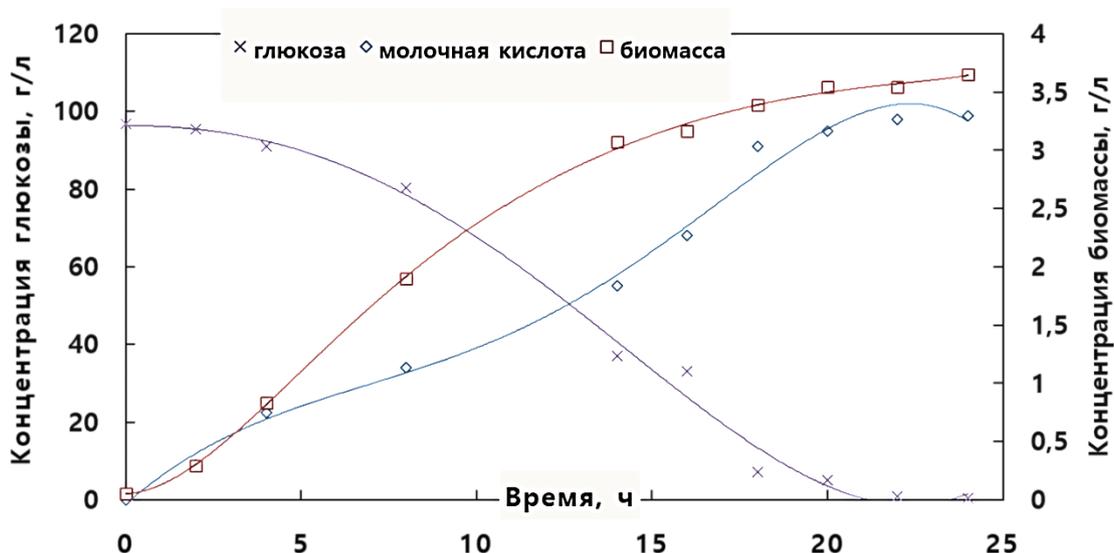


Рис.19. Культивирование *L. paracasei* B4079 на оптимизированной среде с использованием биореактора.

3.2. Исследование контролируемого стрессового воздействия для улучшения показателей биосинтеза молочной кислоты

Целью данной части исследования являлось изучение воздействия оксидативного стресса на физиолого-биохимические характеристики культур молочнокислых бактерий. Для проведения основных исследований предварительно было необходимо определить сублетальную концентрацию пероксида водорода и провести серию пассирований культуры на фоне воздействия сублетальных доз H_2O_2 с учетом возможного влияния видимого света на стрессированную популяцию лактобацилл.

3.2.1. Определение сублетальной концентрации пероксида водорода

Культивирование проводили при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в колбах Эрленмейера, (объем 100 мл, рабочий объем – 50 мл) на модифицированной ферментационной среде MRS с содержанием 100 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта, $CaCO_3$ 4 масс. %.

При определении сублетальных доз H_2O_2 в качестве посевного материала использовали суточную культуру, также выращенную на модифицированной ферментационной среде MRS. Приняли, что приемлемой сублетальной дозой является такая, которая приводит к уменьшению логарифма числа жизнеспособных

клеток популяции первого пассажа не более чем вдвое через 1 час после внесения H_2O_2 .

С целью определения сублетальной концентрации перексид водорода вносили в дозы от 0,05 г/л до 3 г/л с шагом в 0,05 единиц в культуру, находящуюся в фазе замедленного роста в момент, когда концентрация субстрата (глюкозы) составляла 10-12% от начальной.

Из результатов, представленных на рис. 20, видно, что при принятых условиях сублетальной для данной культуры молочнокислых бактерий является концентрация пероксида водорода, равная 0,3 г/л, которая в дальнейшем была использована для получения линий молочнокислых бактерий, адаптированных к H_2O_2 .

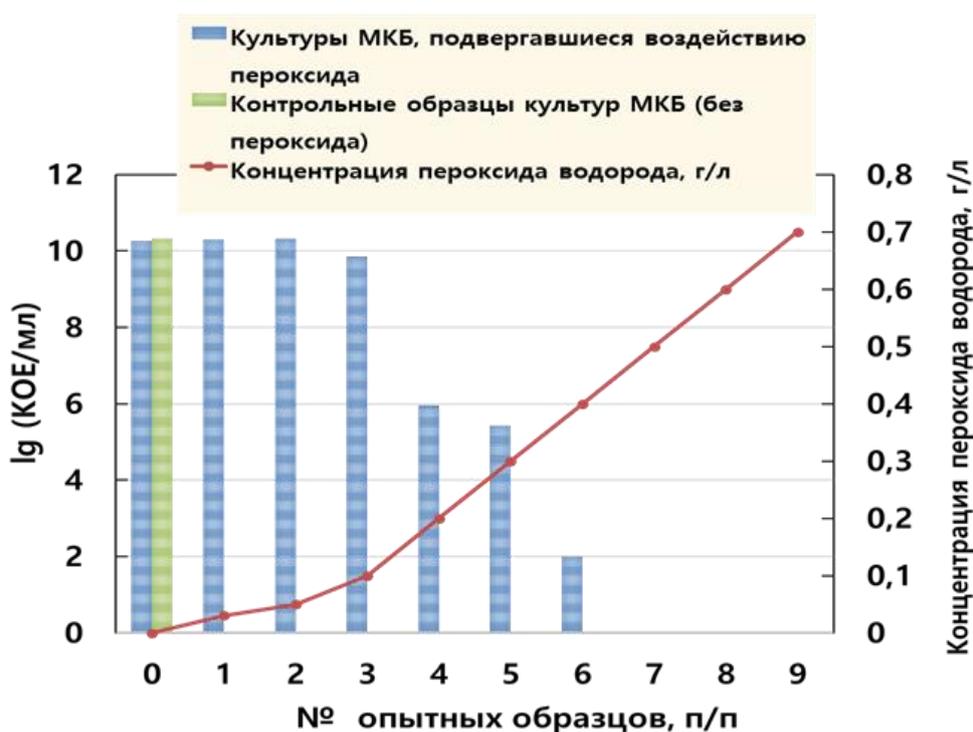


Рис. 20. Определение сублетальной концентрации пероксида водорода.

На рисунке 21 приведены фотографии КОЕ на агаризованной среде MRS для опытных образцов (см. рис.20) № 1 (рис.21А), №3 (рис.21Б) и №5 (рис.21В).



Рис.21. КОЕ на агаризованной среде MRS после внесения пероксида водорода:
концентрация H_2O_2 , г/л: А – 0,05; Б – 0,1; В – 0,3.

3.2.2. Отбор устойчивых к пероксиду водорода культур.

В ходе следующей серии экспериментов осуществлялся отбор устойчивых к пероксиду водорода культур молочнокислых бактерий путем последовательных пассирований в колбах. Использовалась модифицированная ферментационная среда MRS того же состава, что и при определении сублетальных доз H_2O_2 , за исключением концентраций глюкозы: в данном случае часть линий лактобацилл вели при пассировании на среде с содержанием глюкозы 30 г/л, а другую часть – с содержанием глюкозы 200 г/л с внесением и без внесения мела. Культивирование проводилось как на свету (линии С₁–С₃), при уровне освещенности 300 -3000 Лк на поверхности колб, так и в темноте (линии Т₁-Т₃). H_2O_2 вносили в количестве 0,3 г/л при наступлении фазы замедленного роста (при стандартных условиях культивирования – на 18-й час после посева) во все линии С₁–С₃ и Т₁–Т₃. Для каждого эксперимента вели контрольные линии молочнокислых бактерий с пассированием на той же среде, но без внесения H_2O_2 (линии С_{1к}–С_{3к} и Т_{1к}–Т_{3к}).

Культивирование на свету проводилось с учетом возможного участия такого процесса как фоторепарация в адаптации культуры к оксидативному стрессу, поскольку известно, что механизм фоторепарации присутствует у *Lactobacillus casei* [305].

Пассивирование к пероксиду водорода проводили до тех пор, пока доля мертвых клеток МКБ *Lactobacillus paracasei* для пассивированной линии не становилась сопоставимой с долей мертвых клеток в контрольной линии.

Из данных, представленных на рис. 22 и в табл. 10, видно, что по мере адаптации к внесенному перексиду водорода наблюдается прирост в количестве накапливаемой молочной кислоты, причем для вариантов культивирования с освещением этот прирост существеннее и приближается к почти 100% уровню конверсии глюкозы в молочную кислоту.

В контрольных вариантах пассирования (вариант «Контроль» в табл. 10), которые параллельно велись, но без внесения пероксида водорода, уровень накопления молочной кислоты существенно не менялся.

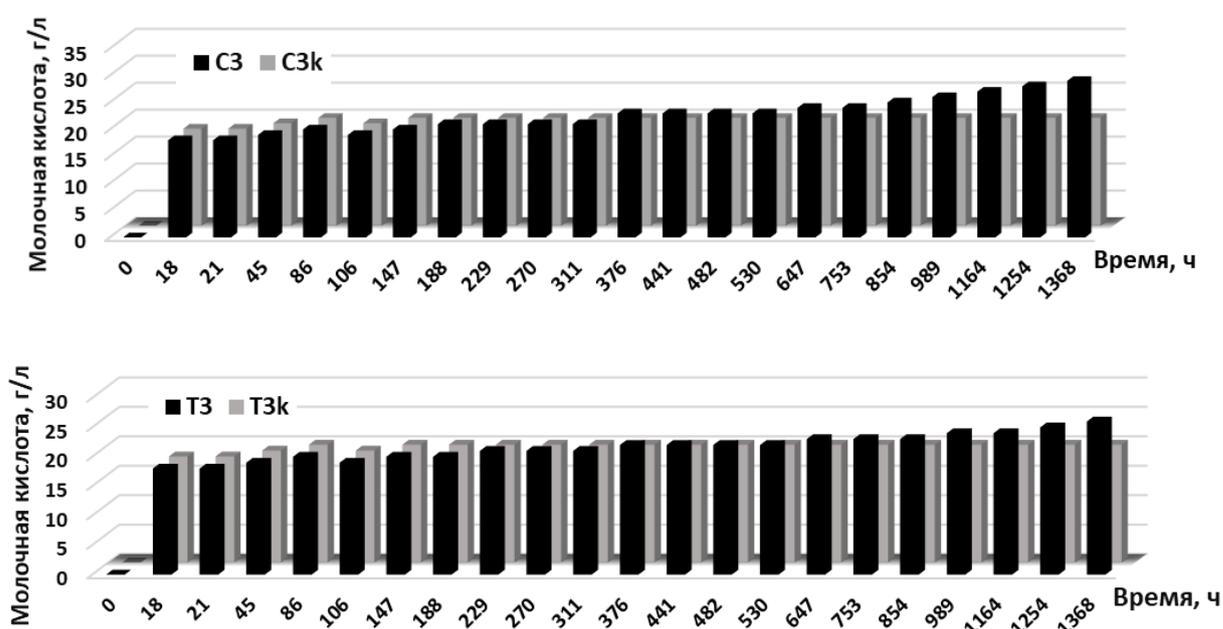


Рис. 22. Изменение конечной концентрации молочной кислоты при культивировании *L. paracasei* с освещением (C₃, C_{3к}) видимым светом среды и без ее освещения (T₃, T_{3к}) по мере увеличения количества пассажей при внесении (C₃, T₃) и без внесения (C_{3к}, T_{3к}) H₂O₂. Концентрация глюкозы в исходной среде 30 г/л.

Таким образом, из полученных данных следует, что при отсутствии освещения среды культивирования видимым светом, молочнокислые бактерии плохо адаптируются к стрессовому агенту (пероксид водорода), выход молочной кислоты меньше по сравнению с контролем, в то время как при освещении среды видимым светом молочнокислые бактерии адаптировались к перексиду водорода,

выход молочной кислоты больше, чем у контрольного варианта. Все это может свидетельствовать об активации механизма фоторепарации.

Таблица 10.

Изменение показателей культивирования по мере пассирования к пероксиду водорода

№ пассажа	Концентрация молочной кислоты, г/л		Выход молочной кислоты, %	
	с освещением	без освещения	с освещением	без освещения
1	18	16	60	53
2	18	16	60	53
3	20	18	67	60
4	20	18	67	60
5	20	18	67	60
6	20	18	67	60
7	20	18	67	60
8	20	18	67	60
9	20	18	67	60
10	20	18	67	60
11	20	18	67	60
12	21	19	70	63
13	21	19	70	63
14	21	19	70	63
15	22	21	73	70
16	23	21	77	70
17	24	21	80	70
18	25	22	83	73
19	26	22	87	73
20	29	23	97	77
21	29,5	24	98	80
Контроль	27		90	

В табл. 11 приведены показатели культивирования для всех вариантов первого пассажа при различной концентрации глюкозы в питательной среде.

Из этих данных видно, что при внесении пероксида водорода в первом пассаже в большинстве вариантов наблюдалось превышение в накоплении биомассы молочнокислых бактерий над контрольными вариантами без внесения H_2O_2 , однако во всех линиях накопление молочной кислоты при внесении H_2O_2 было ниже по сравнению с контрольными вариантами как на свету, так и в темноте. Такие изменения находятся в согласии с литературными данными о повышении уровня накопления биомассы молочнокислых бактерий и снижении накопления молочной кислоты при аэрации среды. Присутствие повышенных концентраций H_2O_2 является признаком аэробных условий.

Таблица 11.

Показатели культивирования *L. paracasei* В4079 в колбах для линий первого пассажа.

Обозначение	Характеристика исходной среды	$C_{мк}$, г/л	$C_{б/м}$, г/л (на 18 ^й час)
C_1	Высокая (200 г/л) концентрация глюкозы, в среде мела нет	30	0,31
$C_{1к}$		35	0,63
T_1		15	0,82
$T_{1к}$		25	0,82
C_2	Высокая (200 г/л) концентрация глюкозы, в среде присутствует мел	11	2,0
$C_{2к}$		13	1,46
T_2		11	2,11
$T_{2к}$		13	1,8
C_3	Низкая (30 г/л) концентрация глюкозы, в среде мела нет	12	4,44
$C_{3к}$		16	1,39
T_3		не измеряли	2,36
$T_{3к}$		11	1,3

С другой стороны, сравнение линий, пассируемых на свету и в темноте, показывает, что на свету количество накапливаемой молочной кислоты превышает таковое в темноте.

На рис. 23 представлены кривые роста линий *L. paracasei* первого пассажа при культивировании на свету и в темноте, демонстрирующие, что количество жизнеспособных клеток при культивировании на свету на 1–2 порядка выше по сравнению с культивированием в темноте. Положительный эффект освещения подтверждают данные хроматографического анализа образцов культуральной жидкости (рис. 24). Из результатов хроматографического анализа также следует, что конечная концентрация МК при пассивировании на свету выше чем в темноте. В условиях полной темноты (обозначение Т) для всех вариантов МКБ с внесением пероксида водорода численность жизнеспособных клеток резко сокращалась по ходу пассирования, однако при рассеянном фоновом освещении не менее 300 Лк (линия С₂ при содержании в среде 4 масс.% СаСО₃ с исходной концентрацией глюкозы 200 г/л, линия С₃ с исходной концентрацией глюкозы 30 г/л, СаСО₃ в среде отсутствует), чтобы падение КОЕ на фоне внесения Н₂О₂ резко замедлилось.

Таким образом, освещение ферментационной среды положительно влияет на показатели биосинтеза при пассировании с внесением Н₂О₂.

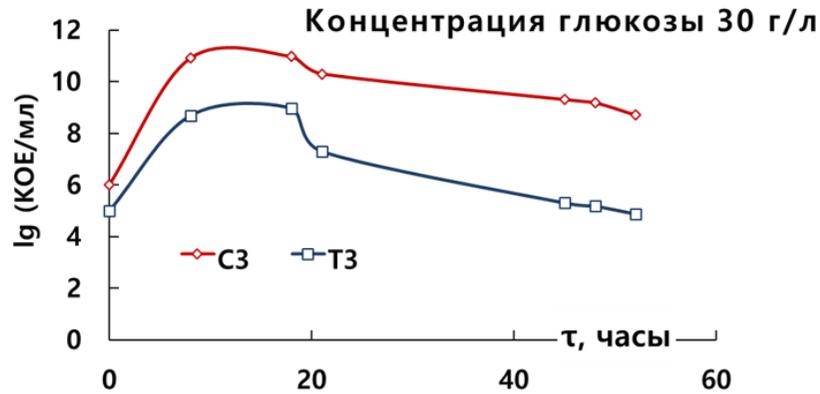
На рис. 25, 26 приведены данные по изменению уровня накопления биомассы на свету и в темноте по мере увеличения количества пассажей при внесении Н₂О₂ (средняя длительность пассажа составляла 48 час) при ведении линий вариантов, представленных в табл. 11. Видно, что:

- 1) во всех контрольных линиях наблюдается постепенное падение уровня накопления биомассы по мере пассирования;
- 2) для контрольных линий с освещением и без такового различия небольшие, т.е. освещение не влияет на культуру МКБ, не подвергавшуюся оксидативному стрессу; схожесть изменений в контрольных линиях при использовании освещения и без него свидетельствует о достоверности различий, наблюдаемых в серии пассажей;
- 3) наибольшее падение наблюдается для линий, пересеваемых при высоких концентрациях глюкозы без стабилизации рН мелом, что понятно, поскольку такие условия вызывают осмотический шок и рН шок,

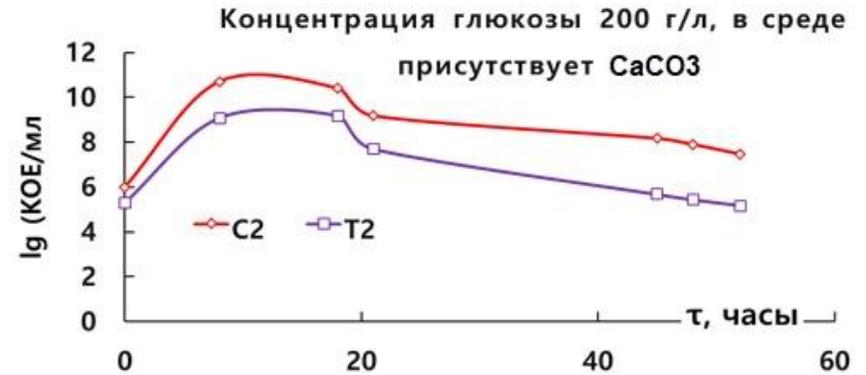
неблагоприятно действующие на рост и численность популяции бактерий; падение в линиях, поддерживаемых на среде с содержанием глюкозы 30 г/л, возможно, также обусловлено неблагоприятными воздействиями, а именно длительным голоданием культуры после исчерпания субстрата в среде (время культивирования в каждом пассаже в среднем составляло 48 ч);

- 4) для линии С₂, поддерживаемой на свету при концентрации глюкозы в исходной среде 200 г/л и стабилизации рН СаСО₃, и линии С₃, поддерживаемой при концентрации глюкозы в исходной среде 30 г/л, наблюдается стабилизация уровня накопления биомассы после 4-5-го пассажей, существенно превышающего таковой в контрольных линиях.

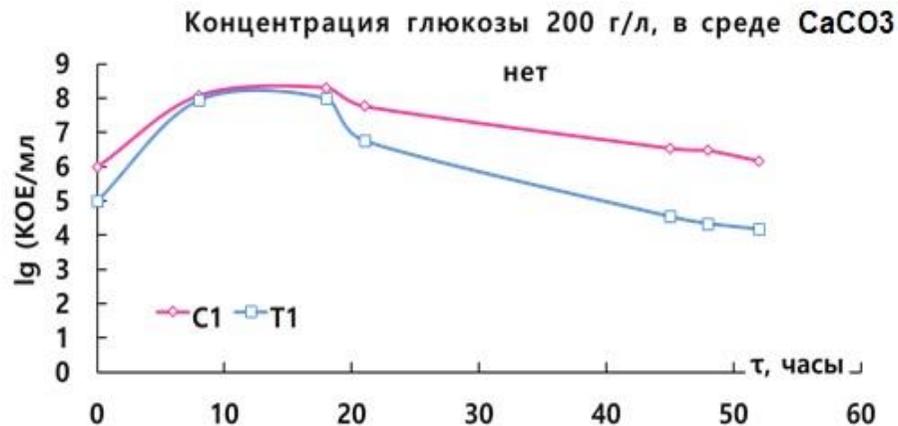
Таким образом, при освещении среды культивирования молочнокислые бактерии адаптируются к действию Н₂О₂, накапливают существенно больше биомассы и молочной кислоты, чем в контроле, и в этих условиях проявляют чувствительность к видимому свету относительно невысокой интенсивности.



А



Б



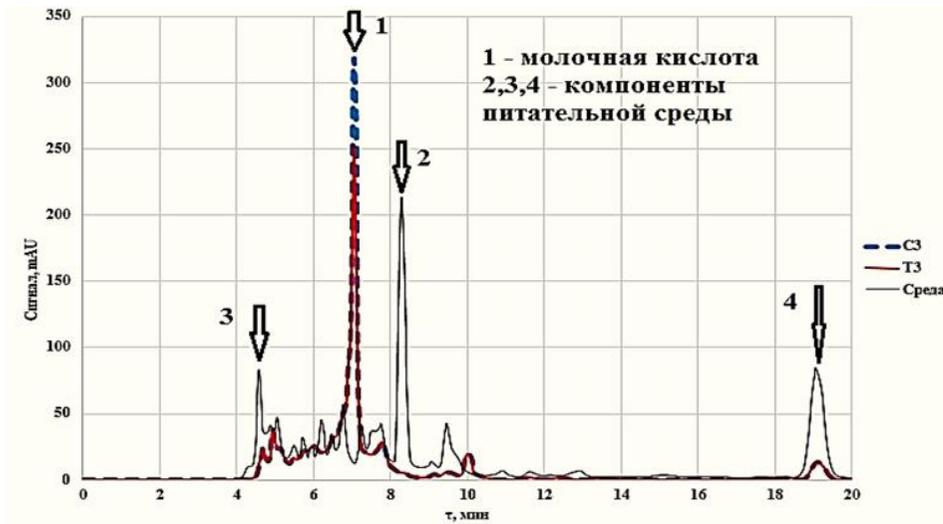
В

Рис. 23. Кривые роста культур *L. paracasei* первого пассажа при культивировании с освещением и без освещения видимым светом:

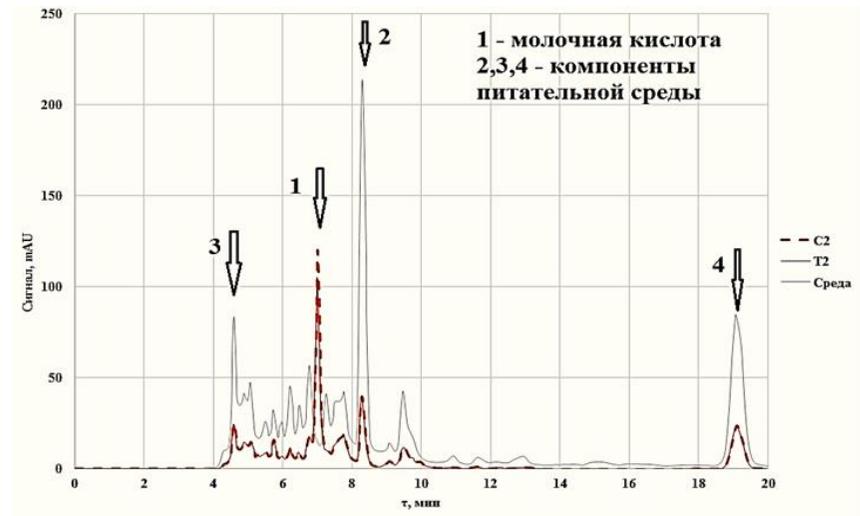
А – Т3, С3 – культивирование с использованием и без использования освещения, концентрация глюкозы 30 г/л;

Б – Т2, С2 – с использованием и без использования освещения, концентрация глюкозы 200 г/л, содержание в среде CaCO₃ 4 масс.%;

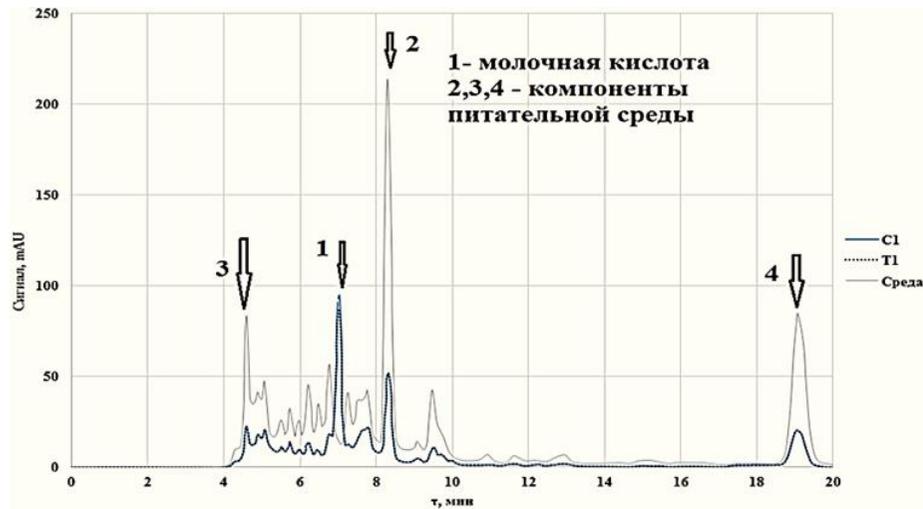
В – Т1, С1 – с использованием и без использования освещения концентрация глюкозы 200 г/л, среда не содержит CaCO₃.



А



Б



В

Рис. 24. Сравнительные хроматограммы (культивирование на свету и в темноте) образцов культуральной жидкости пассированных линий лактобацилл:

А – Т3, С3 – культивирование с использованием и без использования освещения, концентрация глюкозы 30 г/л;

Б – Т2, С2 – культивирование с использованием и без использования освещения, концентрация глюкозы 200 г/л, содержание в среде CaCO_3 4 масс.%;

В – Т1, С1 – с использованием и без использования освещения, концентрация глюкозы 200 г/л, среда не содержит CaCO_3 .

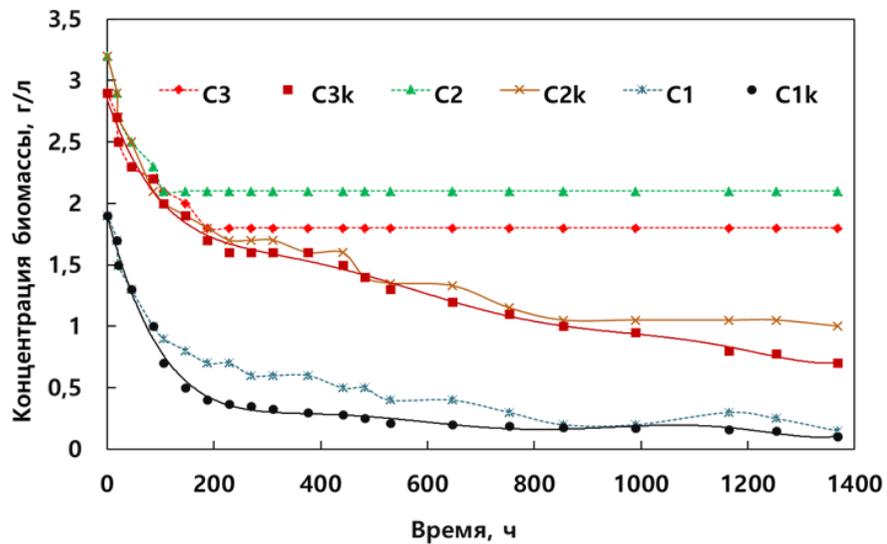


Рис. 25. Изменение конечного уровня накопления биомассы при культивировании с освещением среды видимым светом по мере увеличения количества пассажей при внесении и без внесения H_2O_2 (среднее время культивирования в каждом пассаже составляло 48 ч).

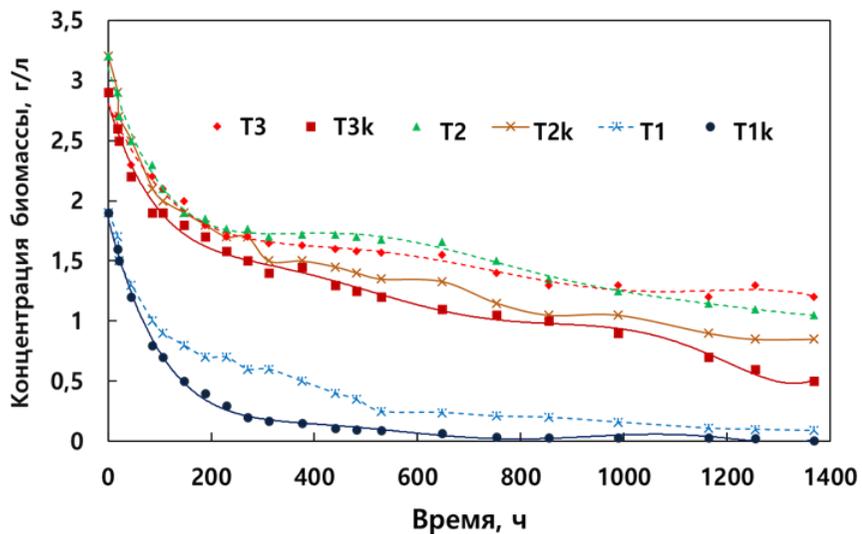


Рис. 26. Изменение конечного уровня накопления биомассы при культивировании без освещения среды видимым светом по мере увеличения количества пассажей при внесении и без внесения H_2O_2 (среднее время культивирования в каждом пассаже составляло 48 ч).

Таким образом, результаты экспериментов с адаптацией культуры молочнокислых бактерий *L. paracasei* В 4079 к внесению сублетальных доз H_2O_2 показали положительное совместное действие пероксида водорода и видимого света на сохранение физиологической активности популяции молочнокислых бактерий, при этом на свету молочнокислые бактерии лучше адаптируются к действию сублетальных доз H_2O_2 , накапливают существенно больше биомассы, их выживаемость и физиологическая активность выше, чем в контроле и в темноте (без использования дополнительного освещения). Стрессированная культура молочнокислых бактерий *L. paracasei* В 4079 приобретает чувствительность к низкоинтенсивному видимому свету. Возможно, такая чувствительность может быть обусловлена значимостью функционирования системы фоторепарации при оксидативном стрессе.

3.2.3. Культивирование контрольных и стрессированных линий в ферментере.

Для подтверждения положительных эффектов контролируемого оксидативного стресса при совместном воздействии H_2O_2 и видимого света проводили культивирование контрольных и стрессированных линий в ферментере.

Использовалась питательная среда MRS с содержанием глюкозы – 110 г/л, дрожжевого экстракта – 7,5 г/л. Инокулятом служила суточная культура МКБ, выращенная на среде MRS. Количество вносимого инокулята составляло 10,0 %. Объем среды в ферментере – 3 л.

Результаты экспериментов представлены в табл. 12 и на рис. 27.

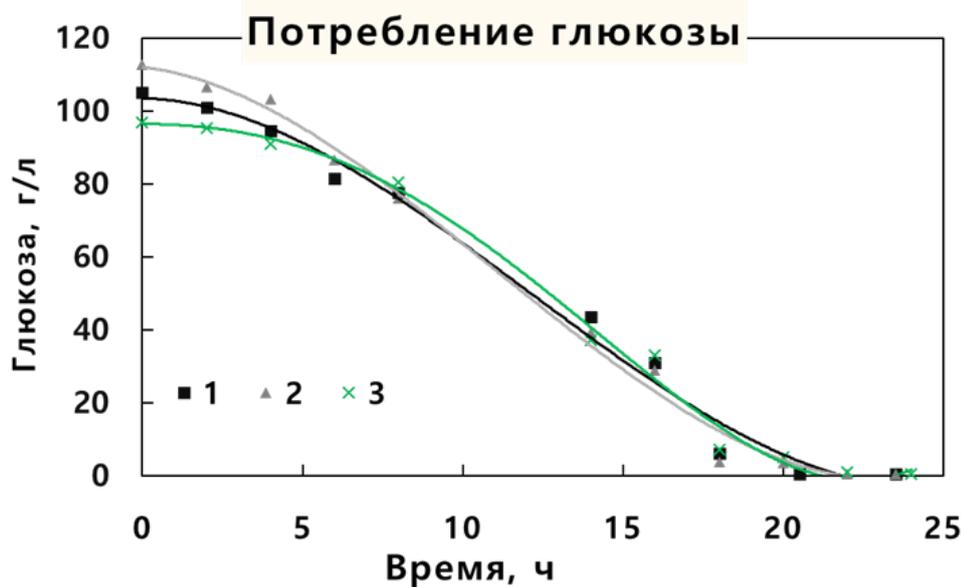
Представленные результаты демонстрируют, что сублетальная концентрация пероксида водорода заметно влияет на неадаптированную культуру – ее рост тормозится, концентрация накопленной молочной кислоты значительно ниже, чем у стрессированной линии (ср. вариант 2 и вариант 3). Таким образом, преадаптированная культура лучше выдерживает стрессовые условия. Преадаптированная к H_2O_2 линия (вариант 2) на фоне освещения среды несколько превышает по активности и контрольную культуру (вариант 1), о чем можно судить по несколько большей скорости убыли глюкозы и накопления молочной кислоты.

Таблица 12.

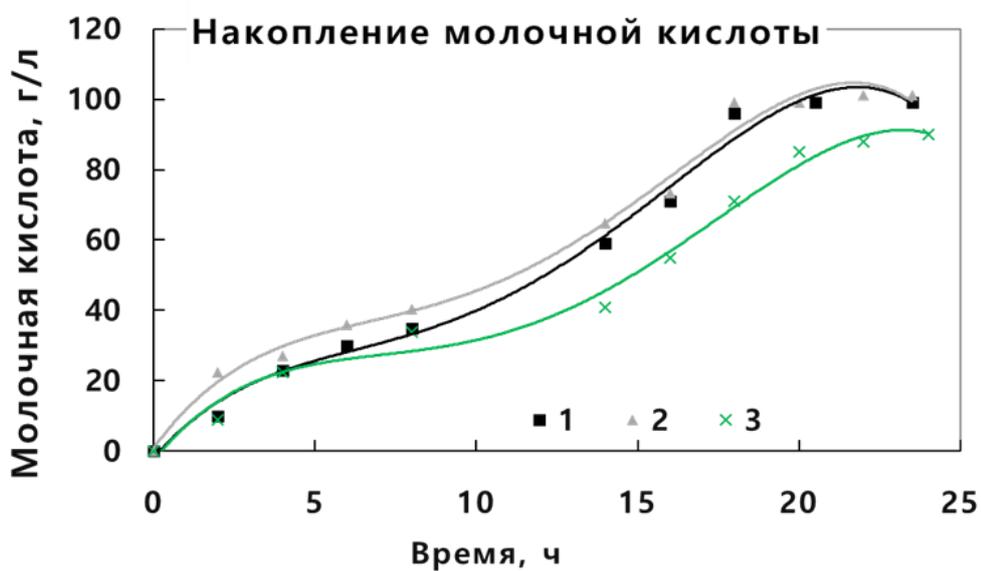
Результаты экспериментов с культивированием контрольных и стрессированных линий *L. paracasei* В4079 в ферментере.

Часы	С(гл), г/л	С (МК), г/л	ОД (кж), опт. ед.	С (б/м), г/л
Контроль (культура не подвергалась воздействию пероксида водорода); при культивировании использовалось затемнение ферментера, пероксид водорода не вносился). Условное обозначение – 1 на рис. 27.				
0	105,0	0	0,28	0,08
4	94,58	23	0,89	0,80
8	77,7	35	3,12	3,44
18	6,02	96	5,6	6,37
20,5	0,5	99	5,79	6,59
23,5	0,5	99	5,65	6,43
Стрессированная линия (культура, подвергавшаяся воздействию пероксида водорода на протяжении 22 пассажей, пассирование происходило при низкой (30 г/л) концентрации глюкозы в среде); на конец седьмого часа культивирования внесено 0,3 г/л H ₂ O ₂ . Культивирование осуществлялось при использовании дополнительного источника освещения – лампы дневного света. Средняя освещенность на поверхности обечайки ферментера – 10800 люкс (измерение проводилось по 8 точкам). Условное обозначение – 2 на рис. 27.				
0	112,73	0	0,39	0,21
4	103,33	27	0,92	0,84
8	76,07	40,5	3,41	3,78
18	3,73	99	5,48	6,23
20	3,52	99	5,45	6,19
23,5	0,5	101,3	5,5	6,25
Контроль (культура не подвергалась воздействию пероксида водорода); на конец седьмого часа культивирования внесено 0,3 г/л H ₂ O ₂ . Культивирование осуществлялось при использовании дополнительного источника освещения – лампы дневного света. Средняя освещенность на поверхности обечайки ферментера – 10800 люкс (измерение проводилось по 8 точкам). Условное обозначение – 3 на рис. 27.				
0	96,82	0	0,26	0,06
4	91,04	22,5	0,92	0,84
8	80,47	34	2,53	2,74

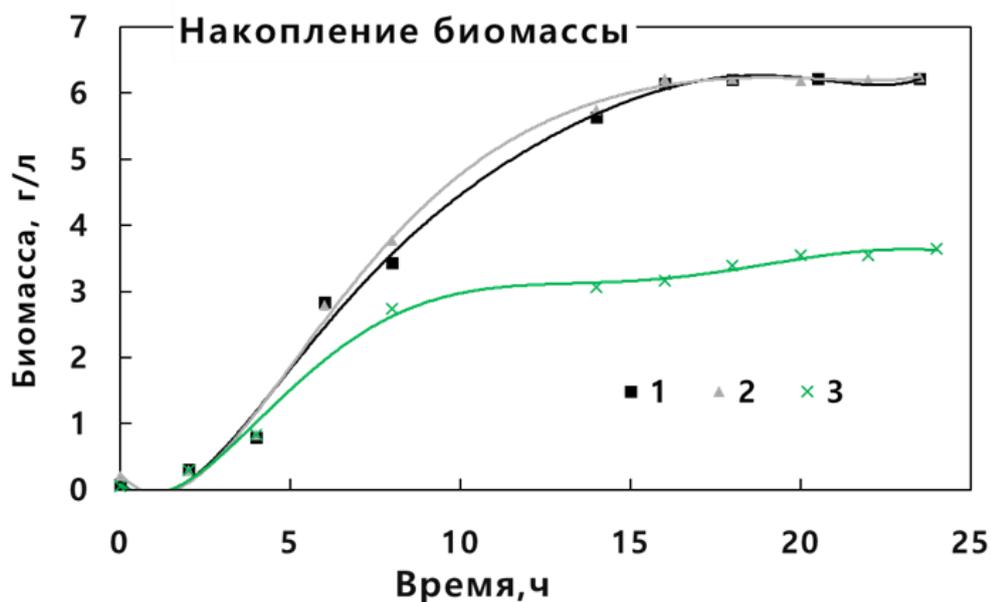
18	7,08	91	3,08	3,39
20	5	95	3,21	3,54
24	0,5	99	3,3	3,65



а) потребление глюкозы в ходе культивирования



б) накопление молочной кислоты в ходе культивирования



в) накопление биомассы в ходе культивирования

Рис.27. Сопоставление показателей роста при культивировании в ферментере:

1 – инокулят – контроль без внесения пероксида водорода;

2 – инокулят – линия 22 пассажа, адаптированная к пероксиду водорода при концентрации глюкозы в исходной среде 30 г/л с освещением среды и внесением 0,3 г/л H_2O_2 на 7-ой час культивирования;

3 – инокулят – контроль (нестрессированная линия), культивирование в ферментере проводилось с дополнительным освещением с внесением 0,3 г/л H_2O_2 на 7-ой час культивирования.

Теоретически можно было бы предположить, что возникновение чувствительности к свету стрессированной культуры кажущееся, и наблюдаемое сходство роста контрольной нестрессированной культуры (вариант 1 на рис. 27(а-в)) и стрессированной культуры (вариант 2 на рис. 27(а-в)) обусловлено быстрым распадом пероксида водорода в условиях освещения, что приводит к нивелированию различий между ростом адаптированной к H_2O_2 культуры на свету и контрольным, нестрессированным вариантом. Однако в таком случае и рост в условиях освещения биомассы варианта 3 с неадаптированной к стрессу культурой существенно не отличался бы от остальных вариантов, что противоречит данным, представленным на рис. 27(а-в).

Также можно было бы объяснить наблюдаемое сходство роста культур вариантов 1 и 2 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).

Результаты этого эксперимента представлены на рис. 28 и 29.

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.

Об отсутствии сколь-нибудь существенных реакций химического окисления свидетельствует и сравнение представленных на рис. 30-36 УФ-спектров водных растворов H_2O_2 , растворов H_2O_2 с компонентами питательной среды.

Так, в среде с 0,3 г/л $MgSO_4$ концентрация H_2O_2 на свету и в темноте за 24 ч выдерживания уменьшалась на 0,8%; с 2 г/л K_2HPO_4 – на свету и в темноте на 1,75%; с 0,05 г/л $MnSO_4$ – на 6,7% на свету и на 2,4% в темноте. Глюкоза и молочная кислота практически не реагировали с H_2O_2 . Определение скорости реакции распада H_2O_2 в присутствии дрожжевого экстракта было осложнено наличием многочисленных пиков на спектре, и было оценено нами как 1,2% за 24 ч.

На рис. 36 представлены УФ-спектры бесклеточной культуральной жидкости, отобранной перед внесением инокулята и по ходу культивирования. Сравнение изменений в спектрах на свету и в темноте не позволяет выявить явной разницы между этими вариантами.

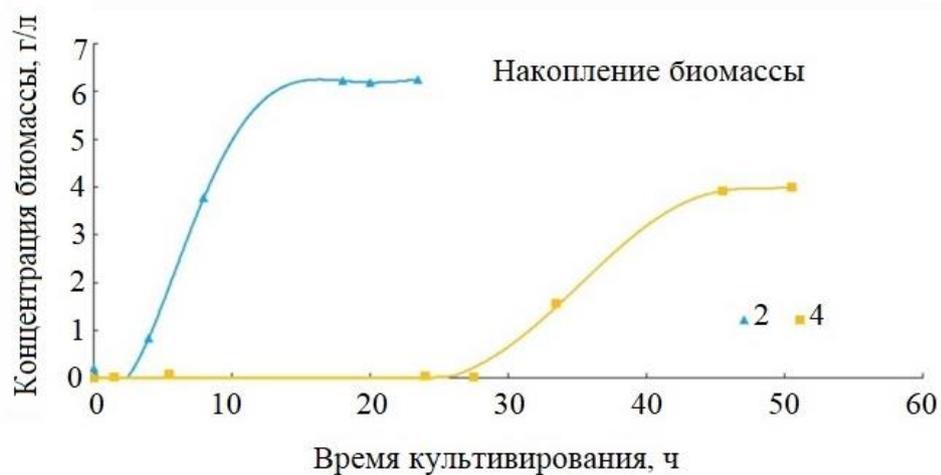


Рис. 28. Накопление биомассы при культивировании стрессированной линии **на свету** (2) и **в темноте** (4) в условиях «холостого» эксперимента. Точка «0» на оси абсцисс соответствует моменту внесения инокулята.

Потребление глюкозы и накопление молочной кислоты в ходе культивирования

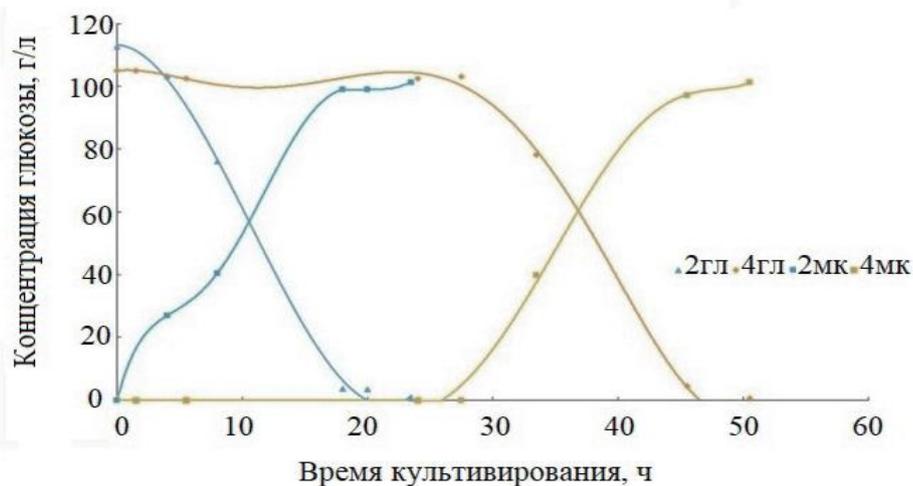


Рис. 29. Потребление глюкозы и накопление молочной кислоты при культивировании стрессированной линии **на свету** (2) и **в темноте** (4) в условиях «холостого» эксперимента.

Таким образом, совокупные данные показывают, что скорость распада пероксида водорода за счет реакции с компонентами питательной среды и на свету, и в темноте незначительна, то есть наблюдаемый в ходе культивирования эффект нивелирования токсичного воздействия H_2O_2 не связан с протеканием фотохимических процессов распада H_2O_2 , а обусловлен биологическими процессами, возможно, фоторепарацией или другими фоточувствительными биологическими реакциями.

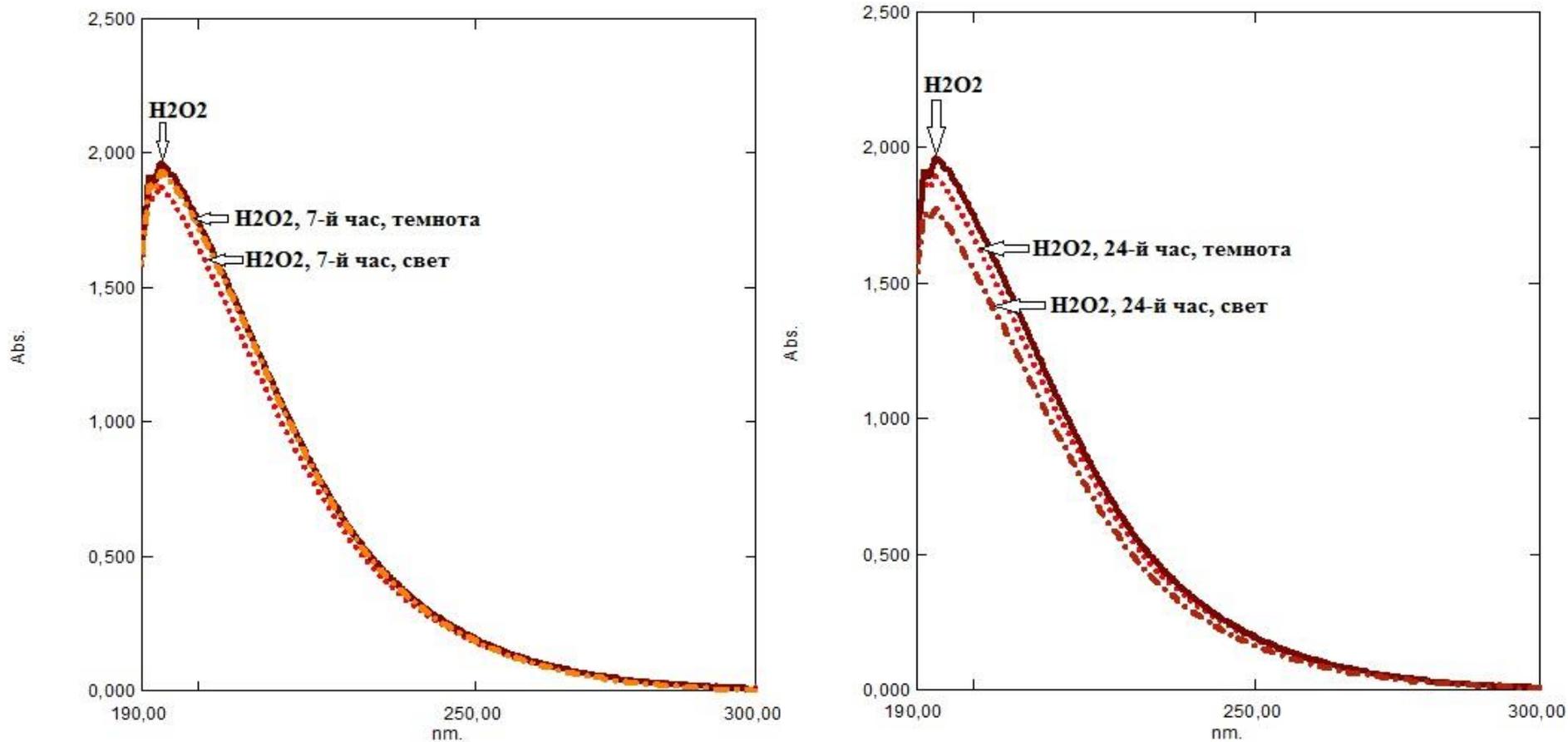


Рис. 30. УФ – спектры водного раствора пероксида водорода.

Исходная концентрация H_2O_2 – 0,3 г/л

В темноте за 7 час пероксид водорода разлагается на 0,3%, за 24 часа - на 2,1%; на свету за 7 час – на 2,9%, за 24 часа - на 6,4%.

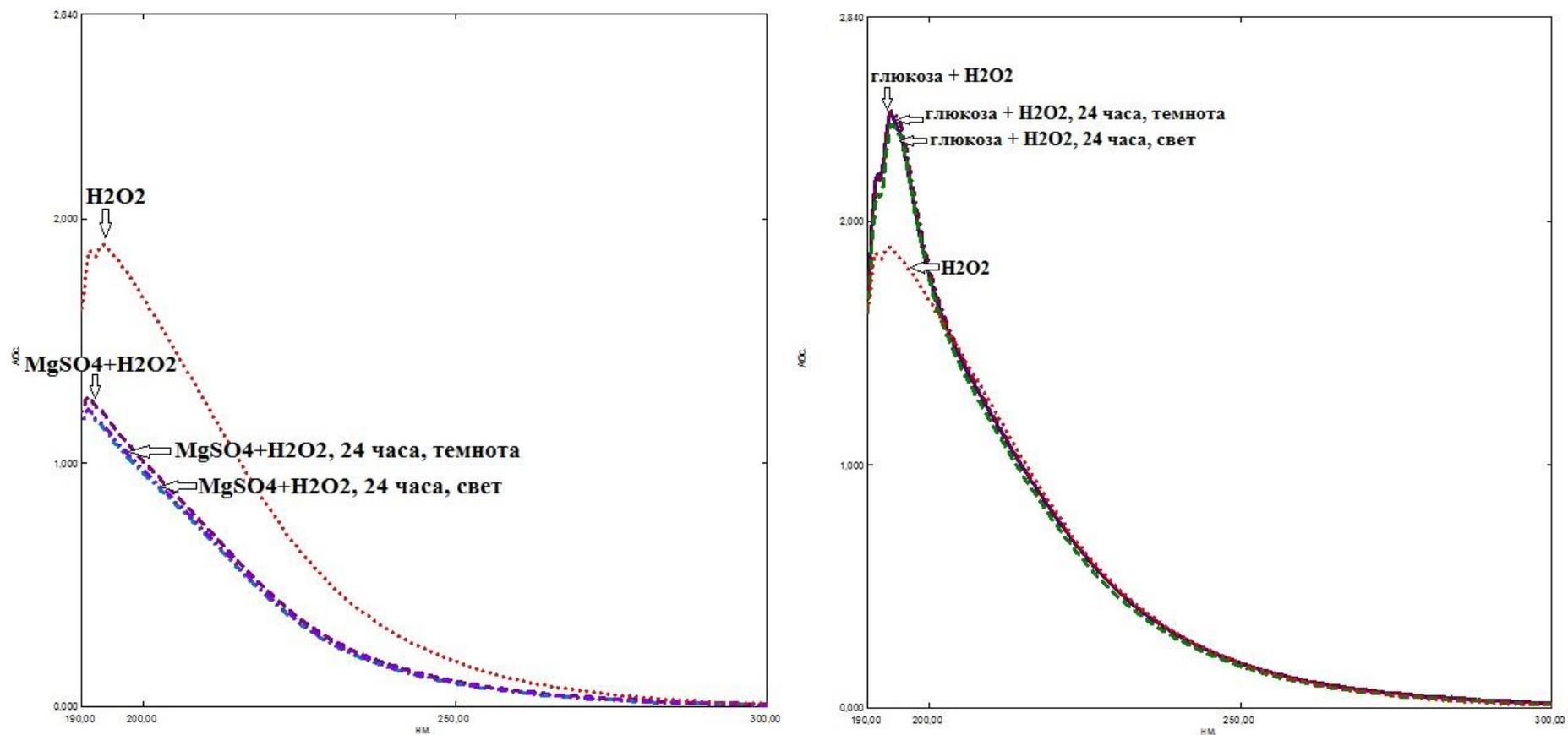


Рис. 31. УФ – спектры водного раствора с компонентами питательной среды в присутствии пероксида водорода.

Исходная концентрация H₂O₂ – 0,3 г/л; концентрация MgSO₄ – 0,1 г/л, концентрация глюкозы – 20 г/л.

За 24 часа содержание H₂O₂ в растворе с добавлением сульфата магния снижается одинаково на свету и в темноте на 0,8%.

Снижения содержания H₂O₂ в растворе с добавлением глюкозы за 24 часа практически не наблюдается.

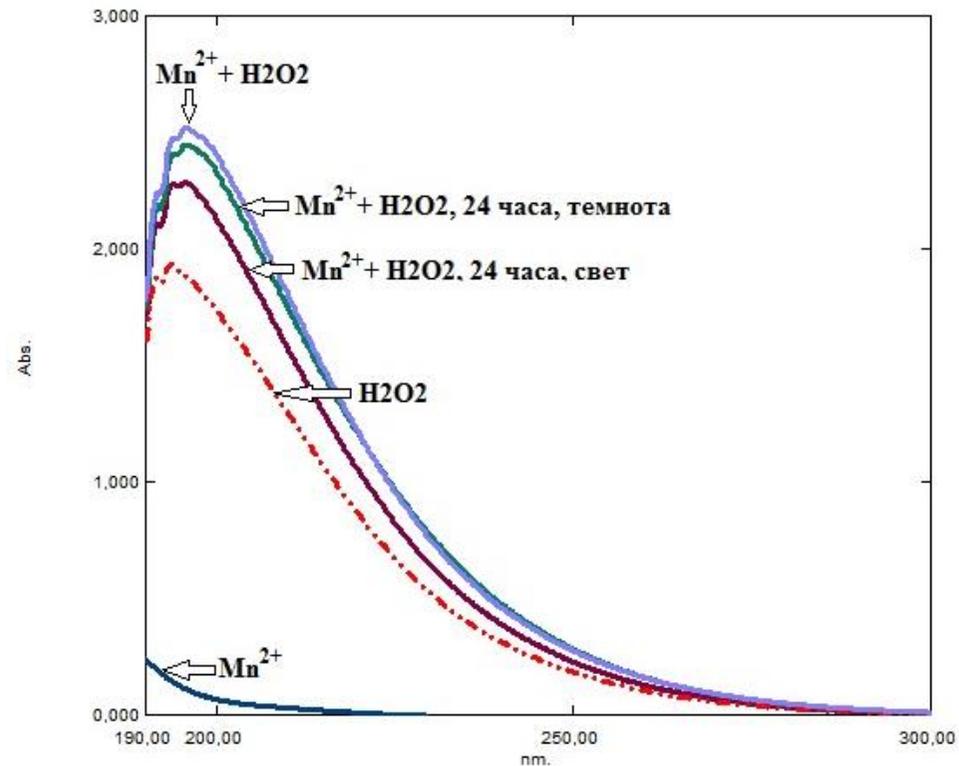
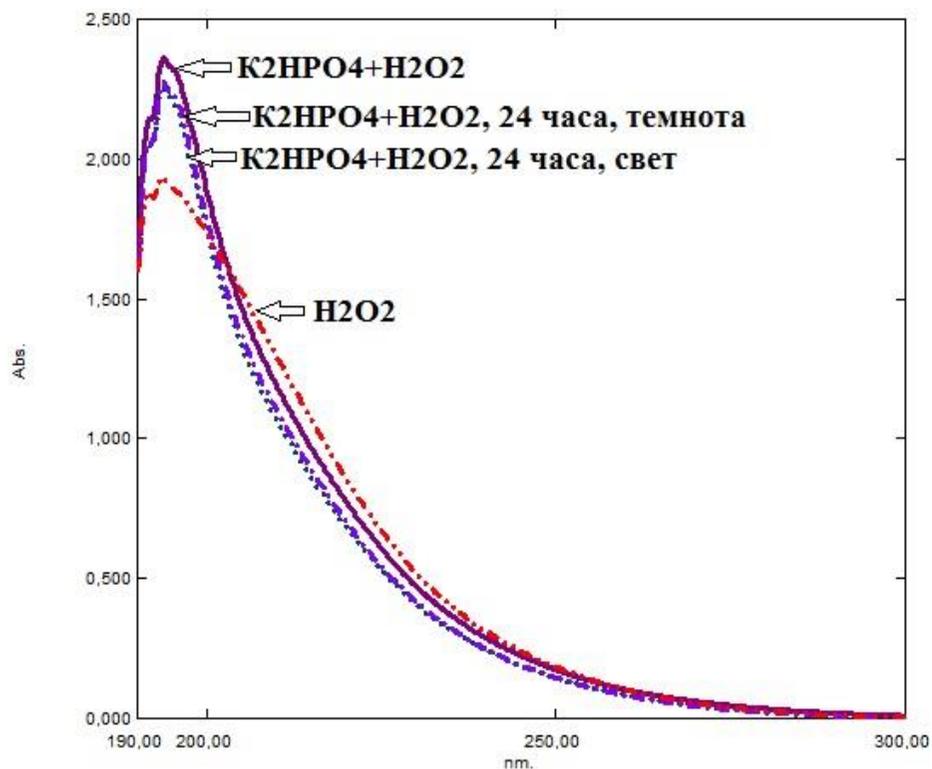


Рис. 32. УФ – спектры водного раствора с компонентами питательной среды в присутствии пероксида водорода.
 Исходная концентрация H_2O_2 – 0,3 г/л; концентрация K_2HPO_4 – 2,0 г/л, концентрация MnSO_4 – 0,05 г/л.
 За 24 часа содержание H_2O_2 в растворе с добавлением K_2HPO_4 снижается одинаково на свету и в темноте на 1,75%.
 Снижение содержания H_2O_2 в растворе с добавлением MnSO_4 за 24 часа составляет 6,7% на свету и 2,4% в темноте.

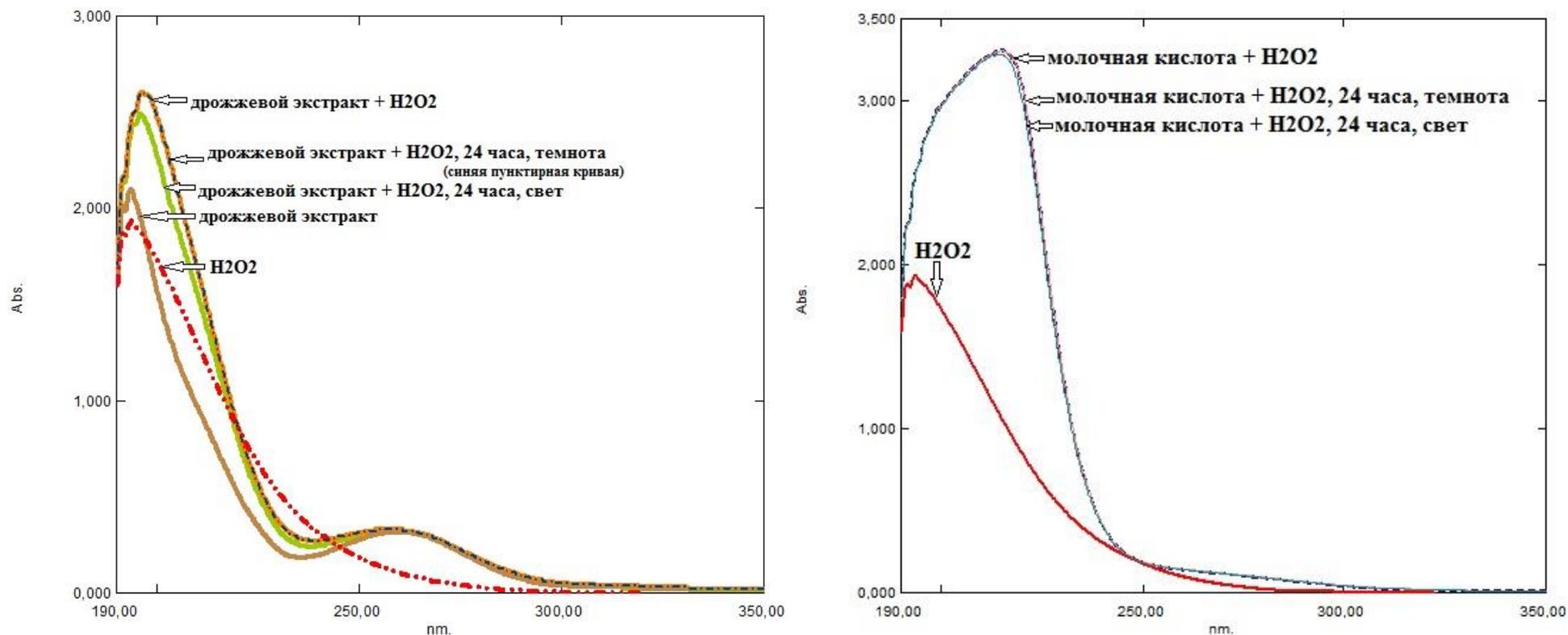


Рис. 33. УФ – спектры водных растворов пероксида водорода в присутствии дрожжевого экстракта и молочной кислоты. Концентрация дрожжевого экстракта в исходном растворе – 7,5 г/л, для получения корректного спектра исходный раствор разбавлен в 100 раз. Концентрация молочной кислоты в исходном растворе – 20 г/л, для получения корректного спектра исходный раствор разбавлен в 5 раз. H₂O₂ добавлен после разбавления растворов с дрожжевым экстрактом или молочной кислотой в количестве 0,3 г/л.

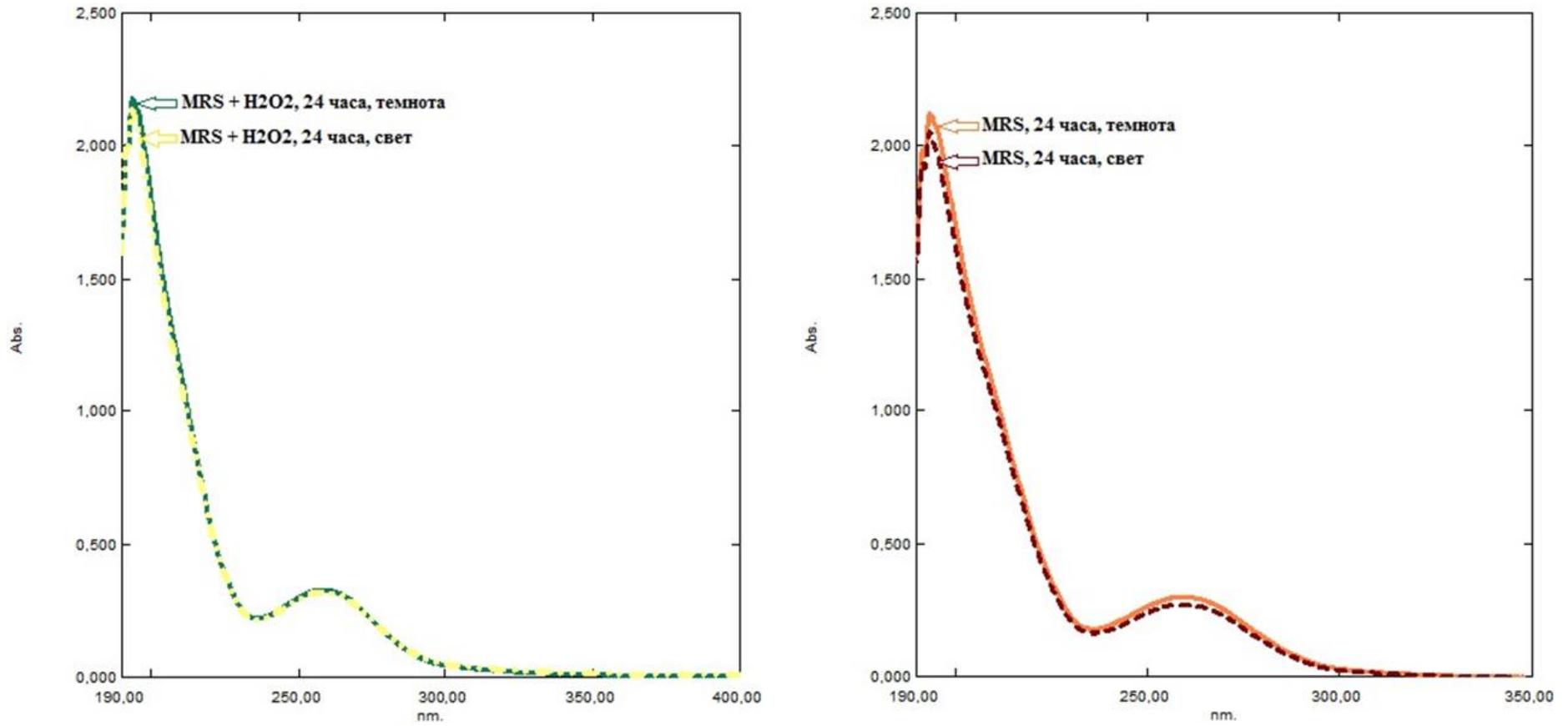


Рис.34. УФ – спектры автоклавированной среды MRS в присутствии H_2O_2 и без H_2O_2 по прошествии 24 часов на свету и в темноте. Спектры снимались относительно дистиллированной воды.

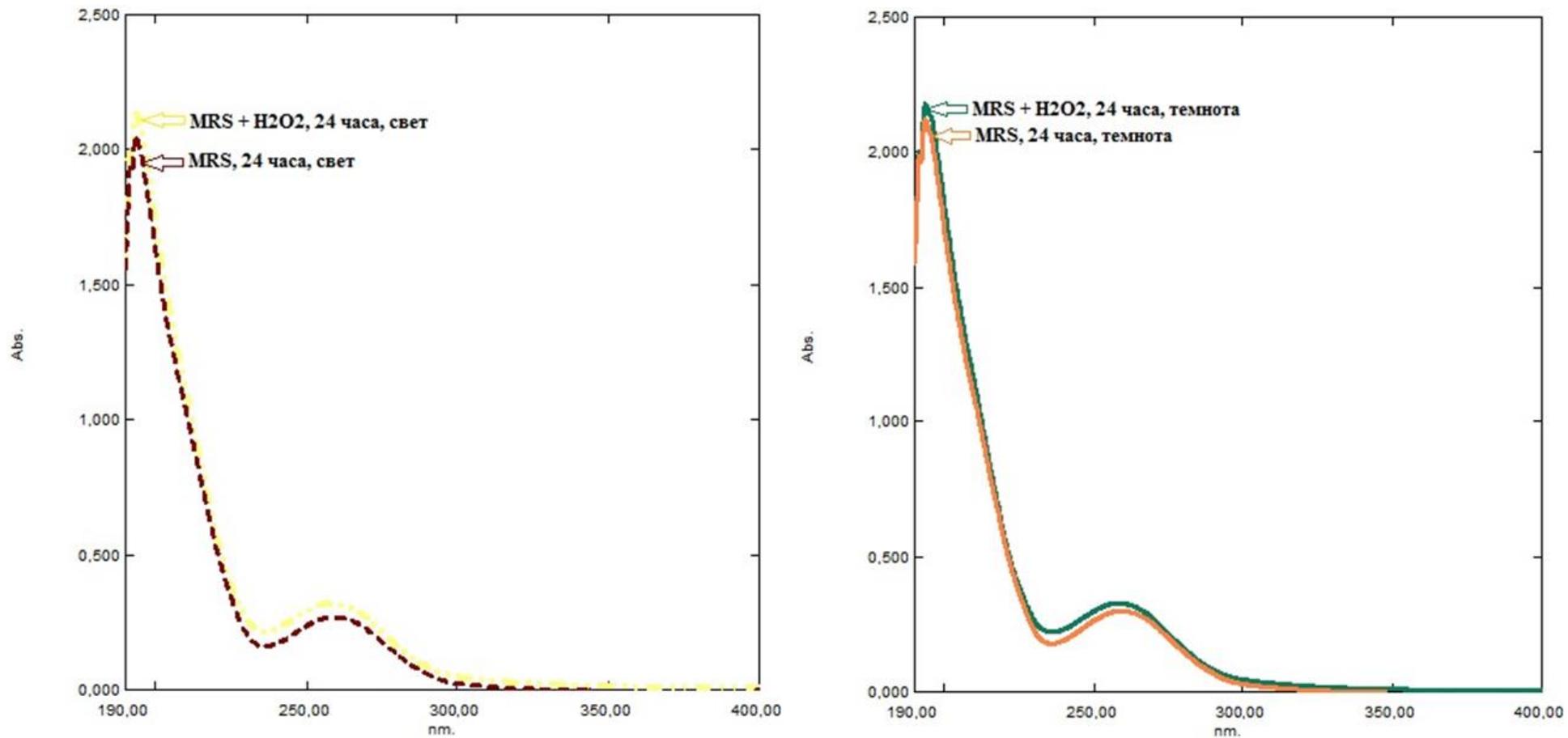


Рис.35. УФ – спектры автоклавированной среды MRS в присутствии H_2O_2 и без H_2O_2 по прошествии 24 часов на свету и в темноте. Спектры снимались относительно дистиллированной воды.

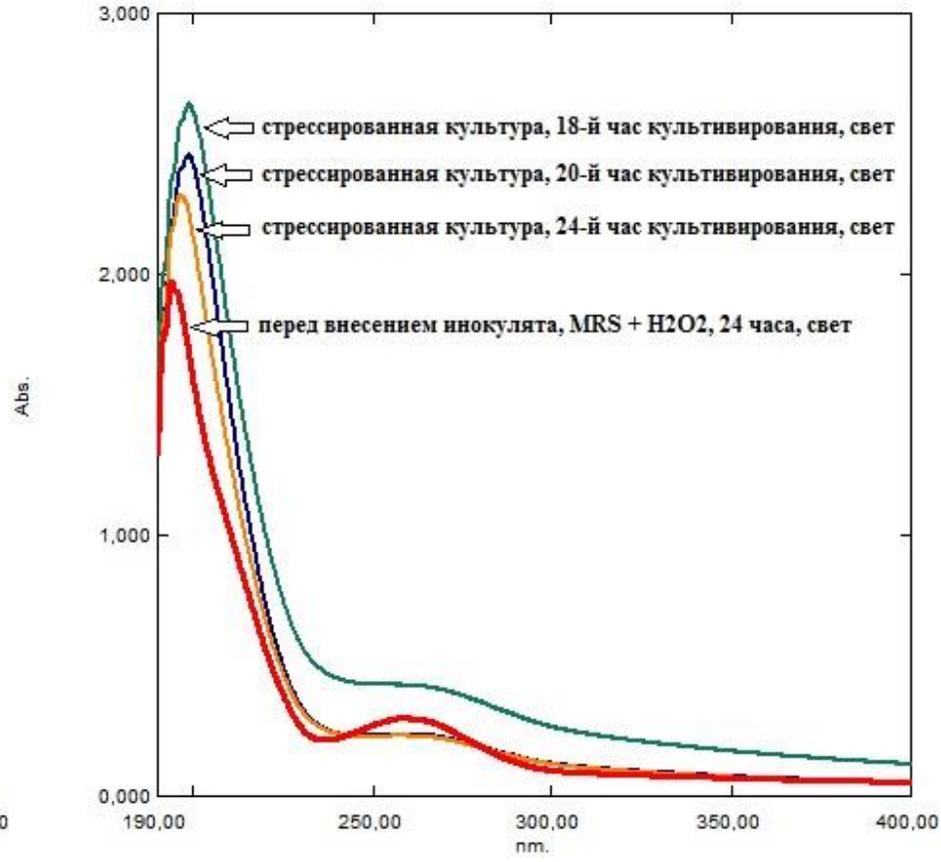
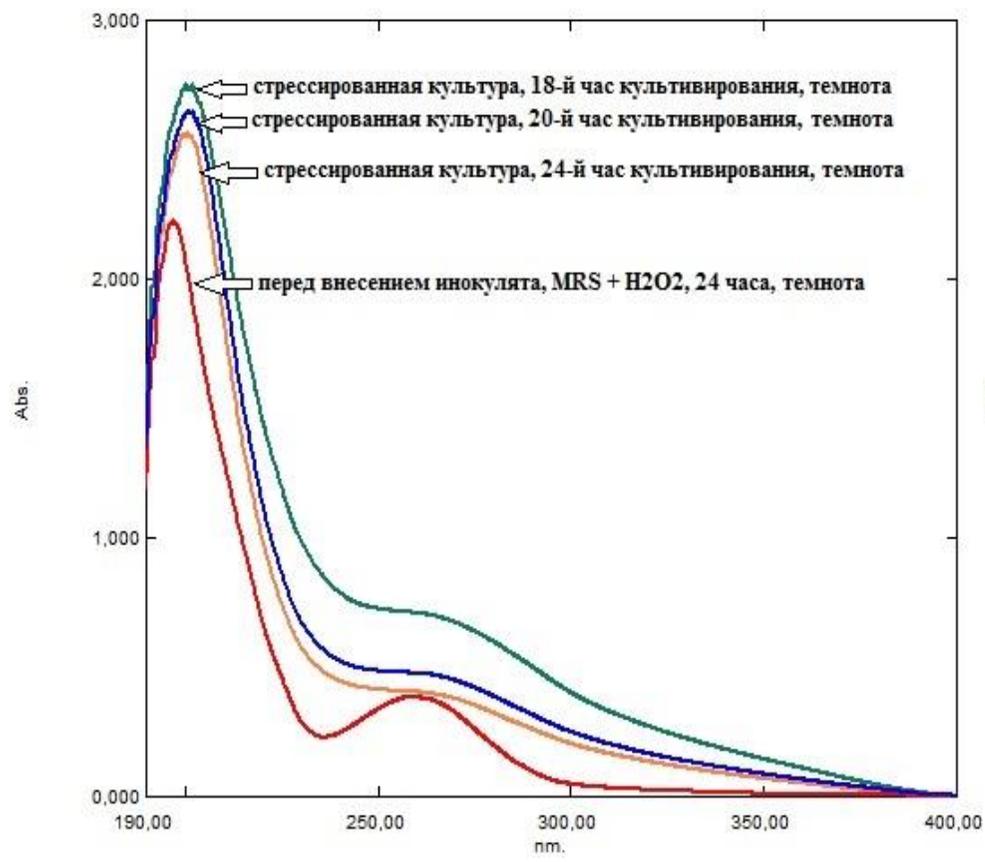


Рис.36. УФ – спектры культуральной жидкости стрессированной линии при ферментации на свету и в темноте.

3.2.4. Определение скорости потери устойчивости к оксидативному стрессу (деадаптация)

Для определения скорости потери устойчивости стрессированной культуры к оксидативному стрессу провели опыты в колбах с пассированием стрессированной линии на свету и в темноте без добавления пероксида водорода. Контролем служила нестрессированная линия, для которой также проводилось пассирование с использованием и без использования освещения.

Пассирование вели на модифицированной среде MRS с содержанием глюкозы – 20 г/л, дрожжевого экстракта – 10 г/л. Инокулятом служила суточная культура МКБ, выращенная с использованием питательной среды того же состава. Всего провели 5 пассирований с пересевом линий на новые среды через каждые 24 час.

Одновременно в конце каждого из пассажей отбирались аликвоты стрессированной суспензии и проводились тестовые острые опыты на устойчивость к пероксиду водорода (пероксид водорода добавлялся в типичной сублетальной концентрации) с использованием культивирования в плоскодонных 96-ти луночных планшетах.

На рис. 37 представлены кривые накопления биомассы в конце каждого из 5 пассажей и рН – профили для вариантов культивирования на свету и в темноте, а на рис. 38 – величины убыли концентрации биомассы (в единицах оптической плотности суспензии микроорганизмов), наблюдаемой для контрольных и стрессированных линий в острых опытах после внесения пероксида водорода.

Приведенные данные показывают, что для контрольных линий освещение не играет существенной роли – кривые накопления биомассы и рН – профили практически идентичны для вариантов культивирования на свету и в темноте. Для стрессированных же линий отмечается некоторое различие для вариантов культивирования на свету и в темноте. Линия на свету медленнее теряет устойчивость к пероксиду водорода, чем линия в темноте. Поскольку в данных экспериментах H_2O_2 в среду не вносился, наблюдаемая разница дополнительно 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, неодинаковой скоростью распада вносимого пероксида водорода в среде на свету и в темноте.

Также видно (рис. 38), что чувствительность стрессированной линии к H_2O_2 без внесения последнего в среду культивирования к пятому пассажу приближается к чувствительности контрольной линии, поскольку разница в изменении оптической плотности по сравнению с контролем, явно выраженная для первого пассажа, становится незначительной к пятому (последнему) пассажу (рис. 38), т.е. к пятому пассажу происходит практически полная деадаптация популяции бактерий к пероксиду водорода.

Как следует из данных, приведенных в табл. 13, по ходу пассирования и адаптации к оксидативному стрессу не наблюдается морфологического расщепления колоний штамма *L. paracasei* В 4079, что указывает на его относительно высокую морфологическую устойчивость к данному стрессовому воздействию.

Таким образом, результаты, полученные в экспериментах с пассированием штамма *L. paracasei* В4079 к пероксиду водорода, указывают на то, что:

- наблюдается процесс адаптации и деадаптации штамма *L. paracasei* В 4079 к пероксиду водорода;
- стрессированная пероксидом культура становится чувствительной к воздействию небольших доз видимого света;
- при использовании линий штамма-продуцента, адаптированных к воздействию пероксида водорода на фоне воздействия низкоинтенсивного видимого света, возможно достижение относительно небольших, но стабильно наблюдаемых положительных эффектов в отношении увеличения выхода молочной кислоты, снижения содержания побочных внеклеточных продуктов метаболизма – примесей в бесклеточной культуральной жидкости, которые влияют на дальнейшее выделение молочной кислоты.

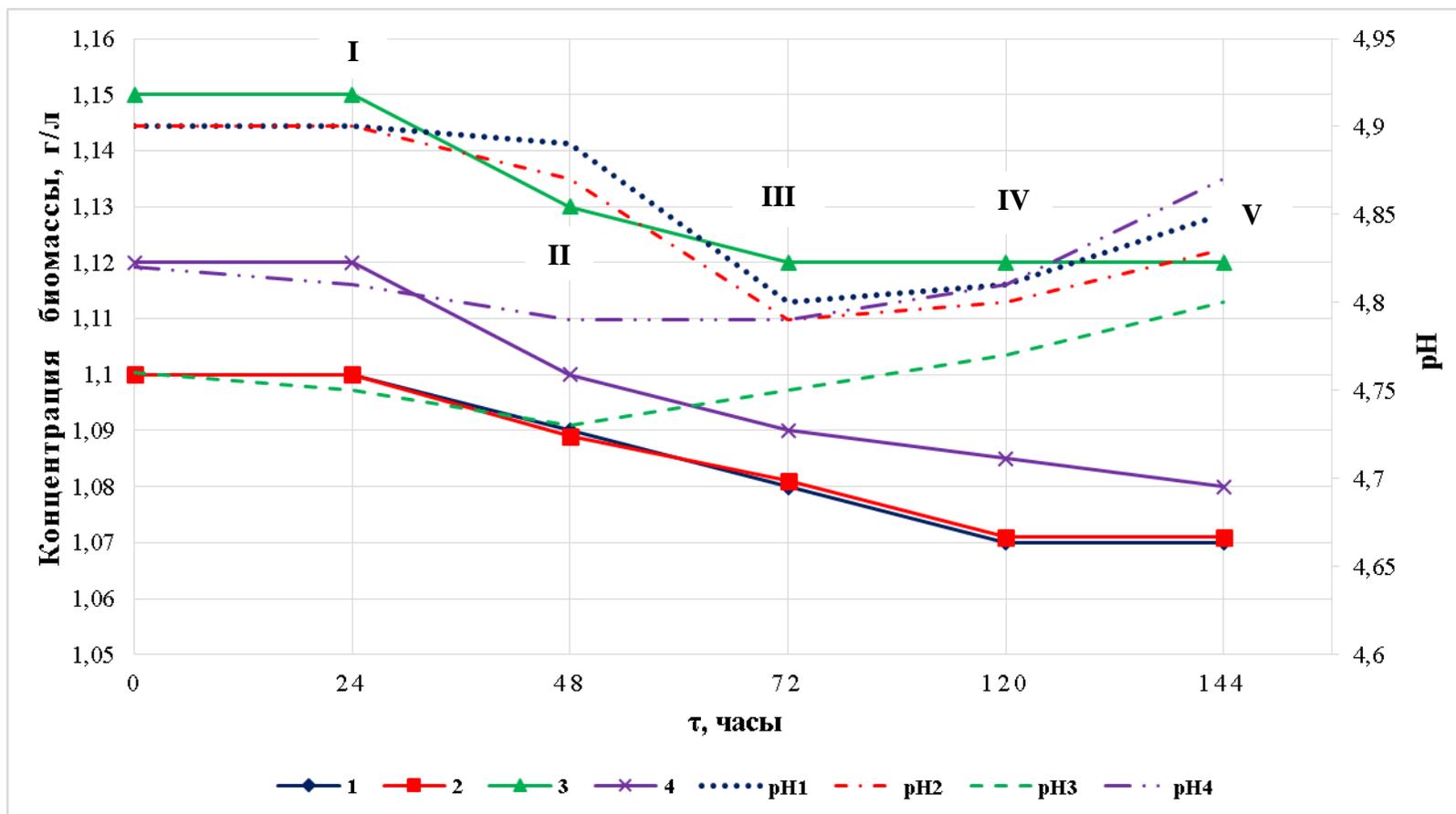


Рис. 37. Накопление биомассы в каждом из пассажей и pH –профили для вариантов культивирования на свету и в темноте (1 – контрольная линия, культивирование на свету, 2 – контрольная линия, культивирование в темноте, 3 – стрессированная линия, культивирование на свету, 4 – стрессированная линия, культивирование в темноте). Римские цифры – пассажи.

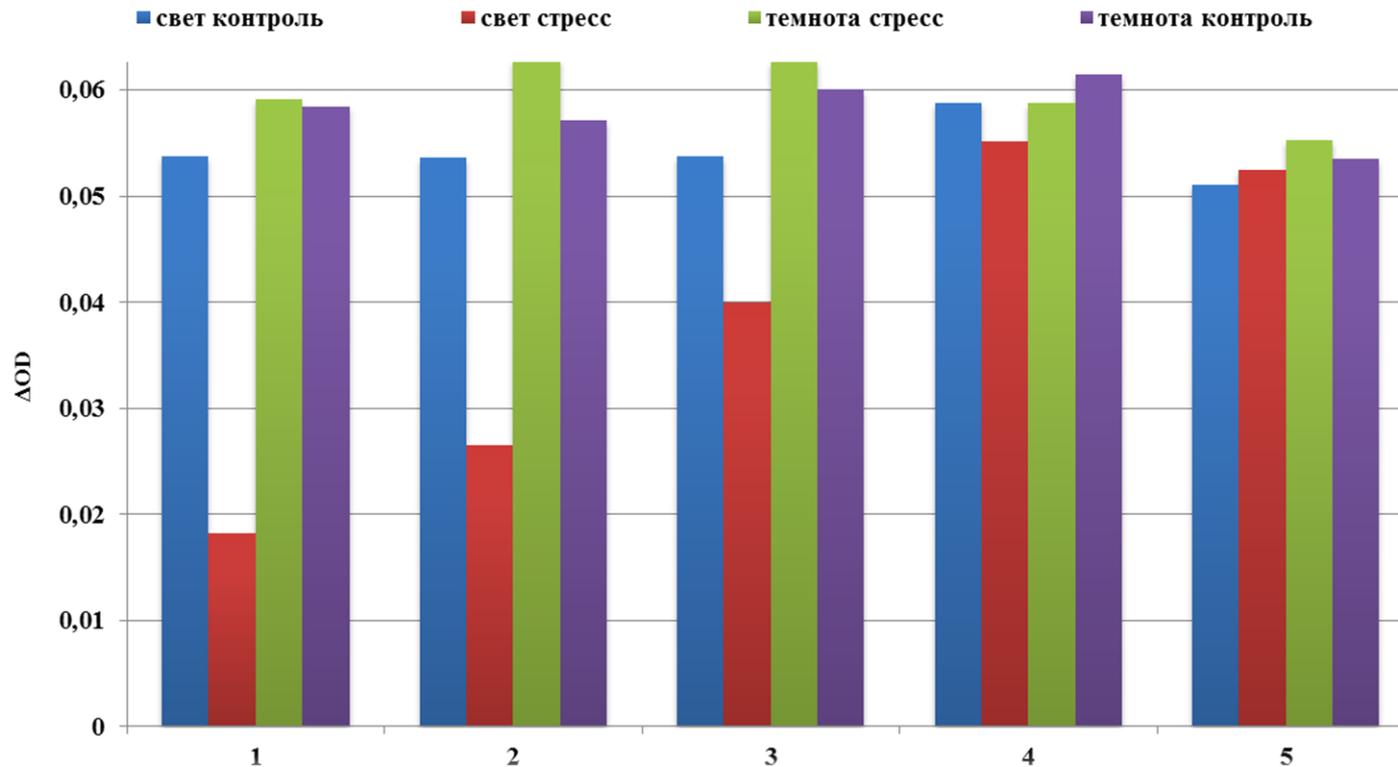


Рис. 38. Падение в оптической плотности суспензии микроорганизмов (выраженное как $|\Delta OD|$) для контрольных и стрессированных линий при проведении тестовых острых опытов на устойчивость к пероксиду водорода (пероксид водорода добавлялся в типичной сублетальной концентрации, время экспозиции составляло 1 час, 1- 5 – номера пассажиров; аликвоты отбирались в поздней стационарной фазе).

Сравнение морфологии колоний молочнокислых бактерий в ходе пассирования.

Линии	Первый пассаж	Пятый (последний) пассаж
Стрессированная линия, культивирование осуществлялось на свету		
Контрольная линия, культивирование осуществлялось на свету		

<p>Стрессированная линия, культивирование осуществлялось в темноте</p>		
<p>Контрольная линия, культивирование осуществлялось в темноте</p>		

3.2.5. Исследование температурного воздействия на МКБ

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.

В литературном обзоре (раздел 1.8 «Стресс и стрессовое воздействие на микроорганизмы») уже отмечалось, что системы ответа на различные стрессы взаимно пересекаются и дополняют друг друга. В частности, у лактобацилл гены, отвечающие за регуляцию устойчивости к оксидативному стрессу, принадлежат к Б-32 и другим регулонам, связанным, в свою очередь с регулированием ответа клетки на тепловой шок [322]. Таким образом, в данном случае можно предположить возникновение перекрестной адаптации между оксидативным стрессом и тепловым шоком.

С целью изучения перекрестного ответа на стресс культуру, преадаптированную путем воздействия на нее агентов окислительного стресса, подвергали тепловому шоку. Сублетальная температура составляла 52 °С, время экспозиции – 15 минут [190].

Культивирование проводили в лабораторном ферментере Minifors с питательной средой MRS с содержанием глюкозы – 110 г/л, дрожжевого экстракта – 7,5 г/л. Инокулятом служила суточная культура, выращенная на среде MRS. Количество вносимого инокулята составляло 10,0 %.

Наряду с определением содержания биомассы, молочной кислоты, глюкозы в этих экспериментах определяли удельную бродильную активность биомассы молочнокислых бактерий, отобранной на различных фазах роста. Для этого

биомассу в отобранной аликвоте ферментационной среды, объемом 10 мл перед определением удельной активности центрифугировали в течение 10 мин при 9000 об/мин, отмывали и разводили в 10 мл трис-глицинового буфера, который содержал глюкозу (20 г/л) и факторы роста, помещали в мини-реактор в виде термостатируемого сосуда при температуре 37°C с объемом среды 10 мл и далее измеряли концентрацию углеводов сразу после внесения среды с микроорганизмами и спустя 1 час. Общее время отбора, центрифугирования и отмывки перед измерением при этом составляло не более 60 мин. Показатель удельной активности биомассы рассчитывали как количество потребленной глюкозы в единицу времени (t), отнесенную к единице оптической плотности биомассы (D):

$$A = \frac{(C_{2l,1} - C_{2l,0})}{t * D}$$

При проведении экспериментов в фазе активного роста культуры и накопления молочной кислоты (типично через 7-9 час после засева ферментера) поднимали температуру на время 3 час и наблюдали отклик популяции на этот импульсный температурный подъем по изменению угла наклона кривой титрования, который пропорционален скорости накопления молочной кислоты. На рис. 39а-г приведены скрин-шоты монитора с выводимыми показателями регистрируемых параметров.

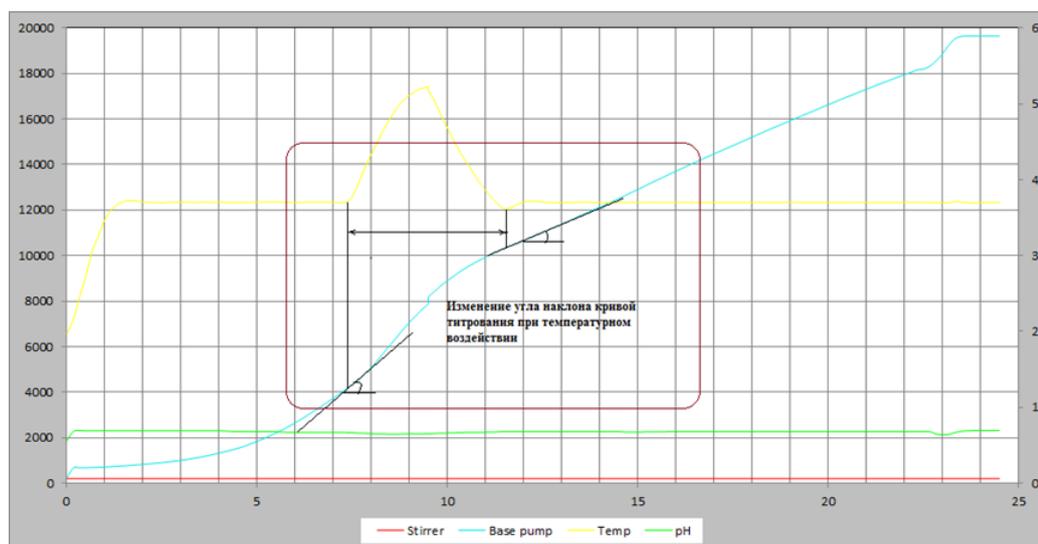


Рис.39а. Регистрируемые параметры в ходе культивирования *L. paracasei* В 4079 для варианта 1.

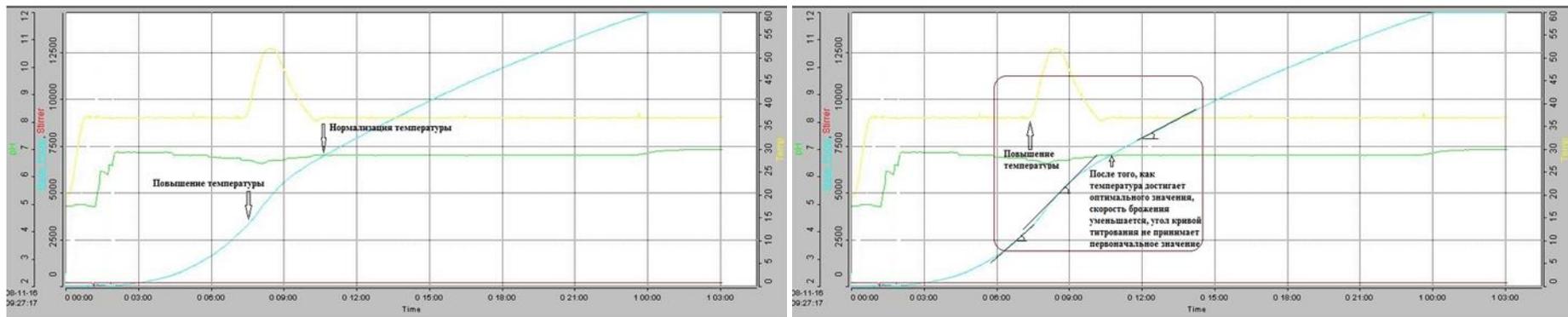


Рис.39б. Регистрируемые параметры в ходе культивирования *Lactobacillus paracasei* для варианта 2.

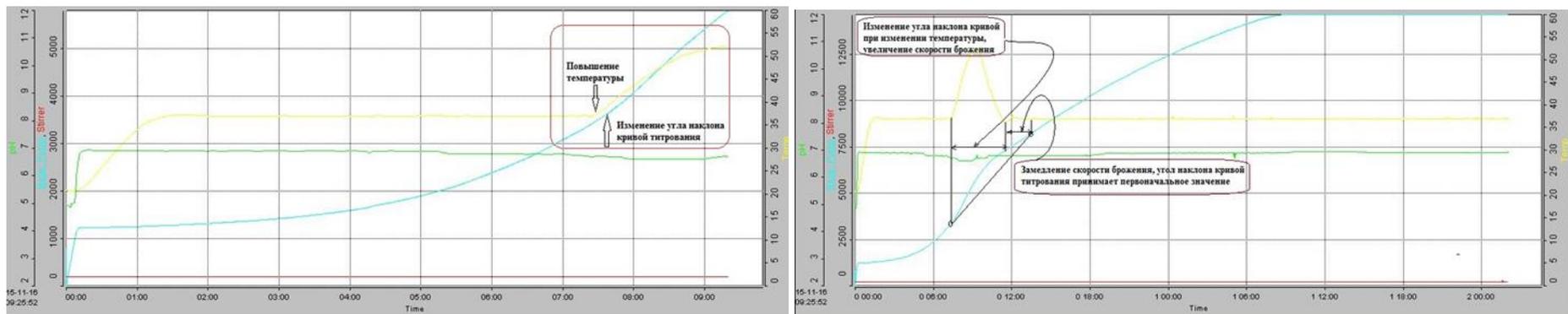


Рис.39в. Регистрируемые параметры в ходе культивирования *L. paracasei* В 4079 для варианта 3 (начало теплового воздействия и окончание культивирования).

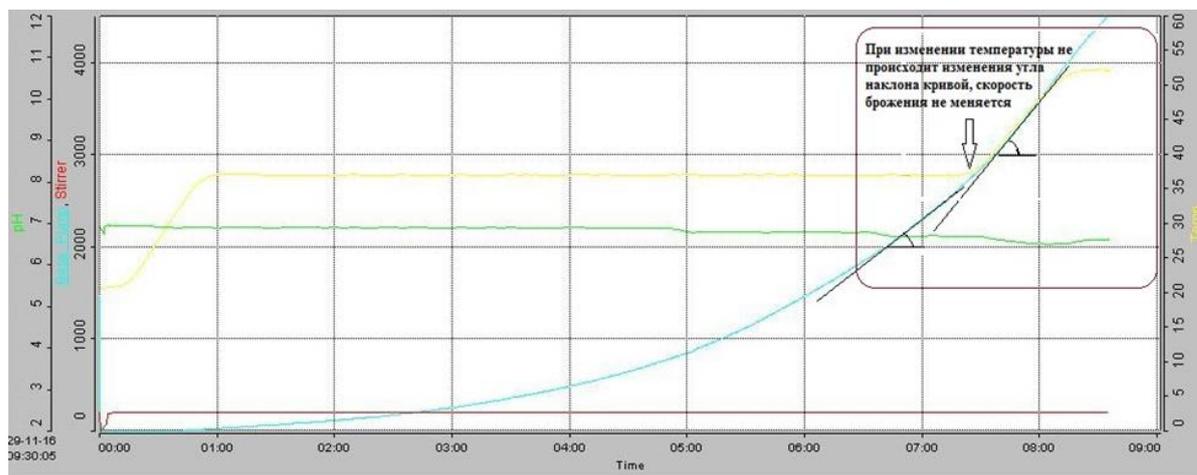


Рис.39г. Регистрируемые параметры в ходе культивирования *L. paracasei* В 4079 для варианта 4 (начало теплового воздействия).

1 - контроль (культура не подвергалась воздействию пероксида); при культивировании использовалось затемнение среды в ферментере (экранирование фольгой). На конец 7-го часа – импульсный подъем температуры до 52 °С.

2 - контроль (культура не подвергалась воздействию пероксида); при культивировании использовалось дополнительное освещение. На конец 7-го часа - импульсный подъем температуры до 52 °С.

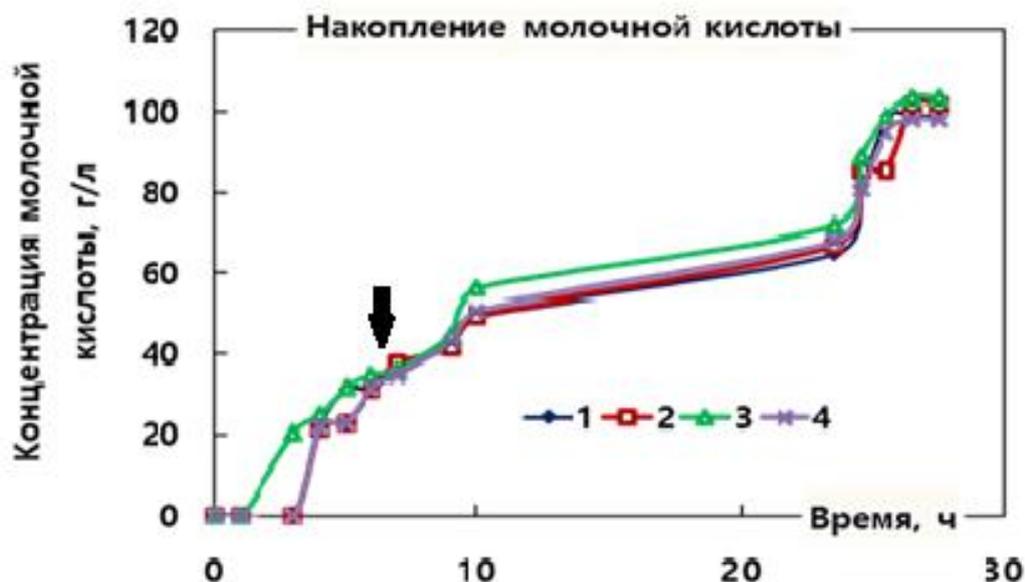
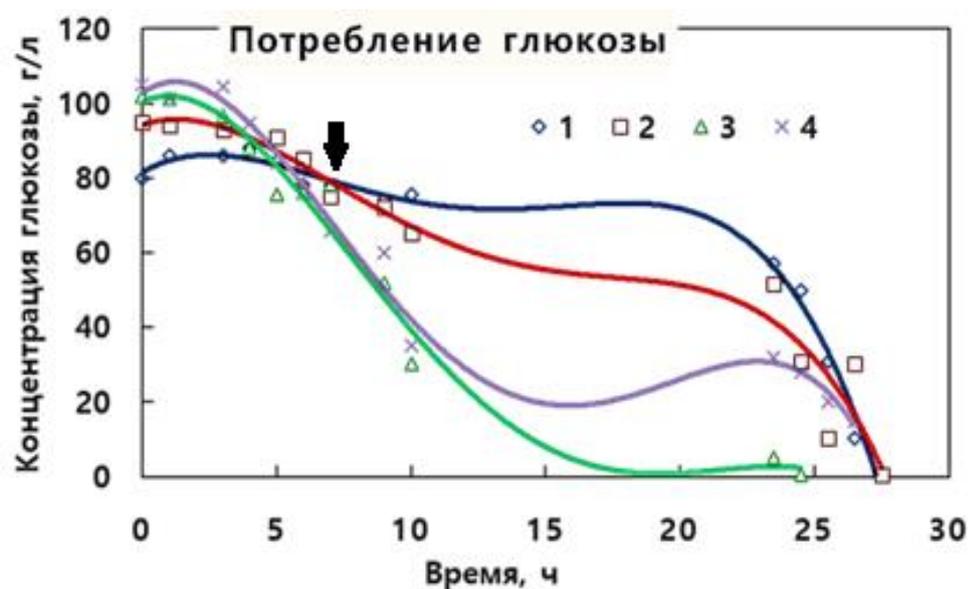
3 - стрессированная линия (культура, подвергавшаяся воздействию пероксида водорода на протяжении 25 пассажей, пассирование происходило при низкой (30 г/л) концентрации глюкозы в среде); при культивировании использовалось дополнительное освещение. На конец 7-го часа - импульсный подъем температуры до 52 °С.

4 – стрессированная линия (культура, подвергавшаяся воздействию пероксида водорода на протяжении 25 пассажей, пассирование происходило при низкой (30 г/л) концентрации глюкозы в среде); при культивировании не использовалось освещение (экранирование фольгой). На конец 7-го часа – импульсный подъем температуры до 52 °С.

На кривых хода регистрируемых параметров можно наблюдать изменение угла наклона кривой титрования при температурном воздействии. Во всех вариантах в первый момент подъема температуры наблюдалось увеличение угла наклона кривых титрования, однако при достижении максимума температуры – он резко падал. Явных отличий в изменении характера хода кривой титрования между всеми вариантами не наблюдалось.

На рис. 40 представлены кривые потребления субстрата, накопления молочной кислоты и биомассы в ходе культивирования для всех четырех вариантов.

Видно, что кривые накопления продукта и потребления субстрата 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 подвергавшиеся ранее оксидативному стрессу (т.е. непреадаптированной 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 субстрата.



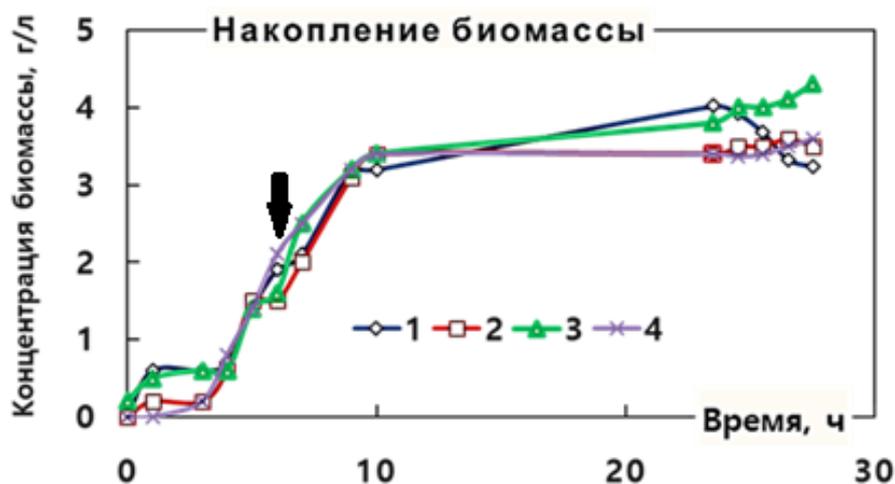


Рис. 40. Сопоставление показателей роста в условиях теплового шока: (импульсный подъем температуры обозначен стрелкой)

1. неадаптированная к стрессу линия, культивирование проводилось без освещения, содержимое ферментера экранировалось фольгой.
2. неадаптированная к стрессу линия, культивирование проводилось с использованием источника дополнительного освещения.
3. адаптированная к стрессу линия, культивирование проводилось с использованием дополнительного освещения.
4. адаптированная к стрессу линия, культивирование проводилось без освещения, содержимое ферментера экранировалось фольгой.

Таким образом, фоточувствительная к видимому свету адаптированная к пероксиду водорода культура более устойчива и к тепловому шоку, т.е. возникает перекрестная адаптация к оксидативному стрессу и тепловому шоку, при этом свет положительно влияет на показатели биосинтеза, даже по сравнению с контрольным нестрессированным вариантом, что свидетельствует о возможном участии фоторепарации в «перекрестной адаптации» и в ответе на стресс.

На рис. 41 представлено изменение удельной (биохимической) активности биомассы (г/(опт.ед*ч)) во время ферментации и по ее окончании в режиме голодания в течение 30 час. Видно, что ход изменения удельной активности для неадаптированных линий (варианты 1 и 2) на свету и в темноте почти не отличается. Стрессированная линия в условиях освещения среды (варианты 3 и 3.1)

обладала наибольшей удельной активностью до 23 часа культивирования. Далее, по мере голодания, удельная активность падала до уровня активности в неадаптированных линиях. Удельная бродильная активность стрессированной линии в условиях затемнения среды (вариант 4) была самой низкой среди всех вариантов.

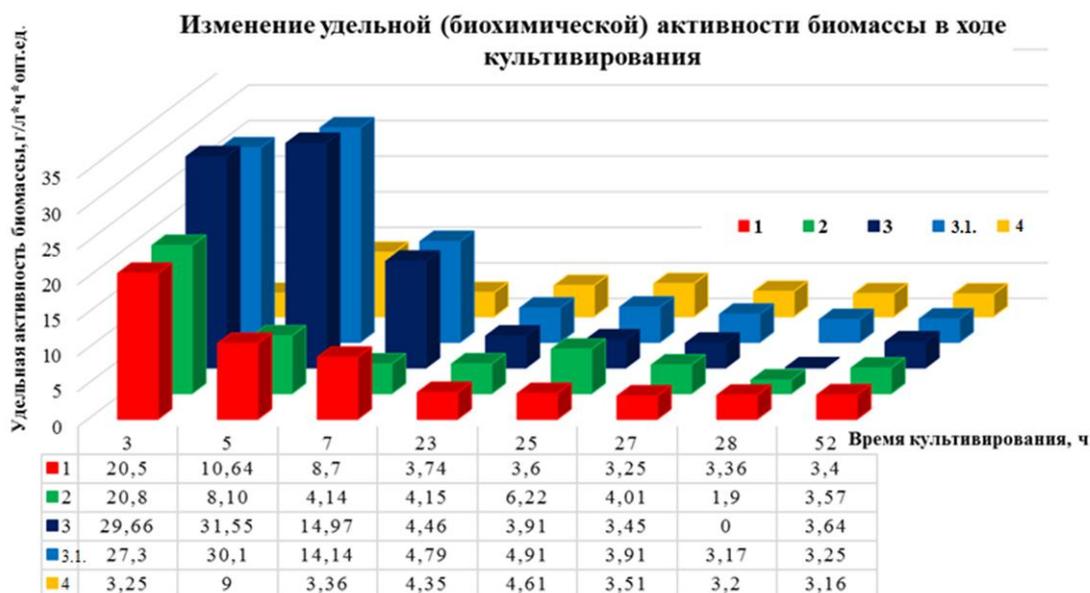


Рис. 41. Изменение удельной (биохимической) активности биомассы в ходе культивирования.

1 - контроль (культура не подвергалась воздействию пероксида); при культивировании использовалось затемнение среды в ферментере (экранирование фольгой). На конец 7-го часа – импульсный подъем температуры до 52 °С.

2 - контроль (культура не подвергалась воздействию пероксида); при культивировании использовалось дополнительное освещение. На конец 7-го часа - импульсный подъем температуры до 52 °С.

3, 3.1 - стрессированная линия (культура, подвергавшаяся воздействию пероксида водорода на протяжении 25 пассажей, пассирование происходило при низкой (30 г/л) концентрации глюкозы в среде); при культивировании использовалось дополнительное освещение. На конец 7-го часа - импульсный подъем температуры до 52 °С.

4 – стрессированная линия (культура, подвергавшаяся воздействию пероксида водорода на протяжении 25 пассажей, пассирование происходило при низкой (30 г/л) концентрации глюкозы в среде); при культивировании использовалось затемнение среды в ферментере (экранирование фольгой). На конец 7-го часа – импульсный подъем температуры до 52 °С.

3.2.6. Изучение влияния осмотического стресса на культуру молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei*.

Из литературных данных известно, что молочнокислые бактерии вида *L. paracasei*, преадаптированные к стрессовым условиям при помощи пероксида водорода или же солей желчи, могут выдерживать экспозицию до часа, не теряя своей жизнеспособности, при концентрациях солей, достигающих 1,5-2 М [190]. Поэтому в следующей серии экспериментов изучали влияние осмотического стресса на культуру молочнокислых бактерий *L. paracasei* В 4079.

В качестве питательной среды использовалась MRS модифицированная с содержанием 20 г/л глюкозы и 7,5 г/л дрожжевого экстракта.

В качестве инокулята использовали суточную культуру *L. paracasei* В 4079. Культивирование проводилось в термошейкере PST-60HL-4 с частотой вращения платформы 250 об/мин в плоскодонных планшетах на 96 лунок (объем 400 мкл, рабочий объем – 125 (100 мкл питательной среды + 25 мкл инокулята), заклеенных пленкой, и в колбах Эрленмейера (объем 100 мл, рабочий объем – 50 мл) в термостате при температуре 37⁰С в темноте и на свету.

При культивировании в планшетах осмотическое воздействие создавалось добавлением в среду NaCl в концентрациях от 0,1 М до 0,3 М с шагом 0,05 М или сахарозы в концентрациях от 0,05 М до 0,25 М с шагом 0,05 М. При культивировании в колбах Эрленмейера осмотическое воздействие создавалось добавлением в среду NaCl в концентрации 0,2 М.

Критическая концентрация NaCl определялась экспериментально (см. ниже), концентрация сахарозы выбрана на основании литературных данных.

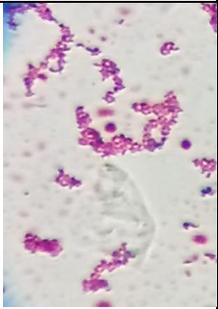
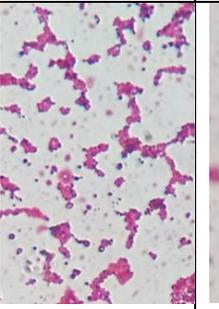
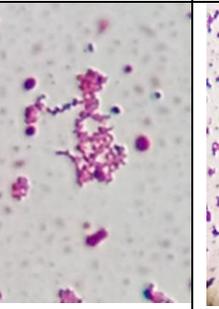
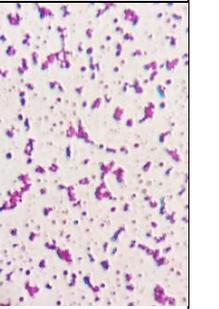
Для определения концентрации NaCl, при которой культура молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei*, неадаптированная к стрессовым условиям при помощи пероксида водорода, может выдерживать экспозицию до часа, не теряя при этом своей жизнеспособности, проводили следующий эксперимент: при наступлении ранней стационарной фазы роста отбирали пробу 10 мл, центрифугировали (12000g; 5 минут; 37⁰С), удаляли надосадочную жидкость.

После чего отмывали дважды с использованием PBS – буфера (12000g; 5 минут; 37°C), затем ресуспендировали в 10 мл растворов NaCl с концентрациями от 0 М до 2М с шагом 0,2М. После часовой экспозиции производили высев на агаризованную среду MRS на чашки Петри (табл. 14).

По результатам эксперимента было определено, что 1 М концентрация NaCl является пороговой, при которой культура молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei*, неприспособленная к стрессовому воздействию пероксида водорода, может выдерживать экспозицию в 1 М концентрации NaCl до часа, не теряя при этом своей жизнеспособности. При высевах проб на агаризованную среду MRS после часовой экспозиции с большими концентрациями NaCl, культура МКБ не росла на чашках Петри.

Таблица 14.

Фотографии клеток адаптированной к стрессовому воздействию культуры молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* под микроскопом после часа экспозиции при различных концентрациях NaCl.

Конц-ия NaCl, М	0 (контроль)	0,6	1,0	1,4	2
1М проб после часа экспозиции, увеличение 1000					

Примечание: Контроль в данном случае (0 М NaCl) – культура молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei*, неприспособленная к стрессовым условиям при помощи пероксида водорода, ресуспендированная в 10 мл стерильной водопроводной воды.

В первой части исследований по влиянию осмотического стресса проводилось параллельное культивирование в плоскодонных планшетах двух линий: адаптированной к стрессу линии (инокулят 25 пассажа) и неадаптированной к стрессу линии (контроль). Через каждый час с момента засева определялась оптическая плотность среды с микроорганизмами; на конец 7-го часа культивирования в лунки планшета в соответствующие варианты были внесены

NaCl или сахаразы в виде концентрированного раствора в количестве, соответствующем расчетным концентрациям в питательной среде.

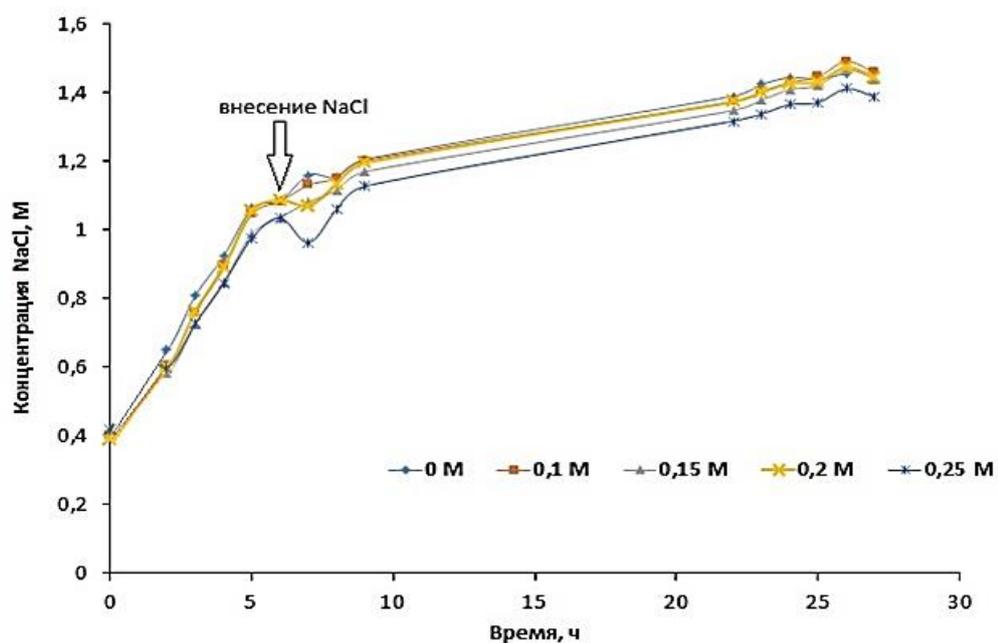


Рис. 42. Кривые роста адаптированной к стрессу линии *L. paracasei* в вариантах с внесением NaCl.

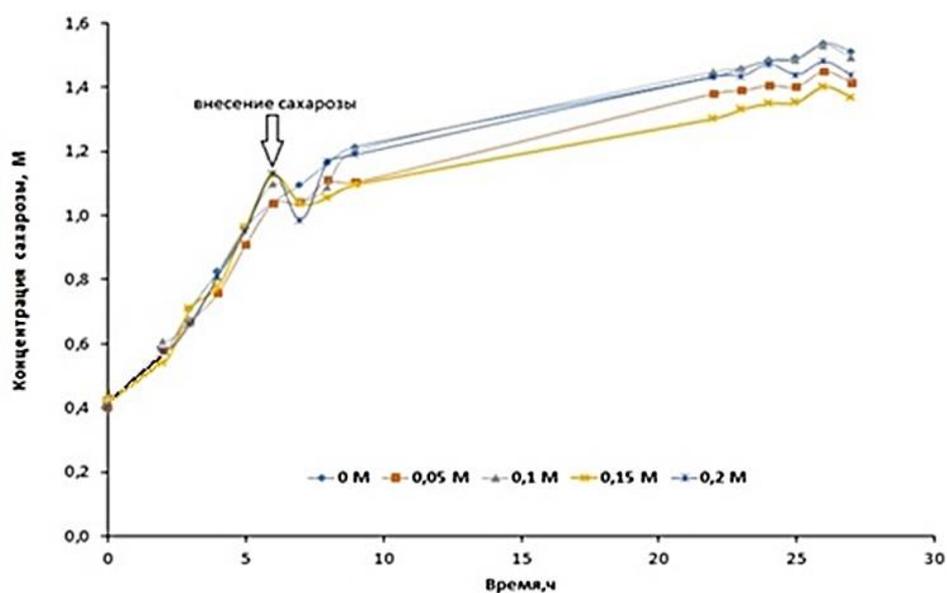


Рис. 43. Кривые роста адаптированной к стрессу линии *L. paracasei* в вариантах с внесением сахаразы.

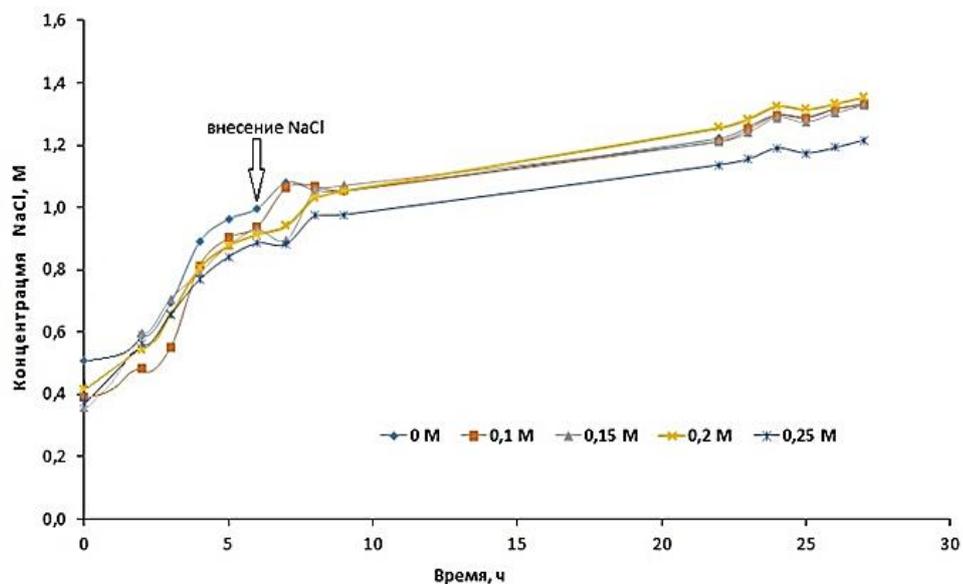


Рис. 44. Кривые роста неадаптированной к стрессу линии *L. paracasei* (контроль) в вариантах с внесением NaCl.

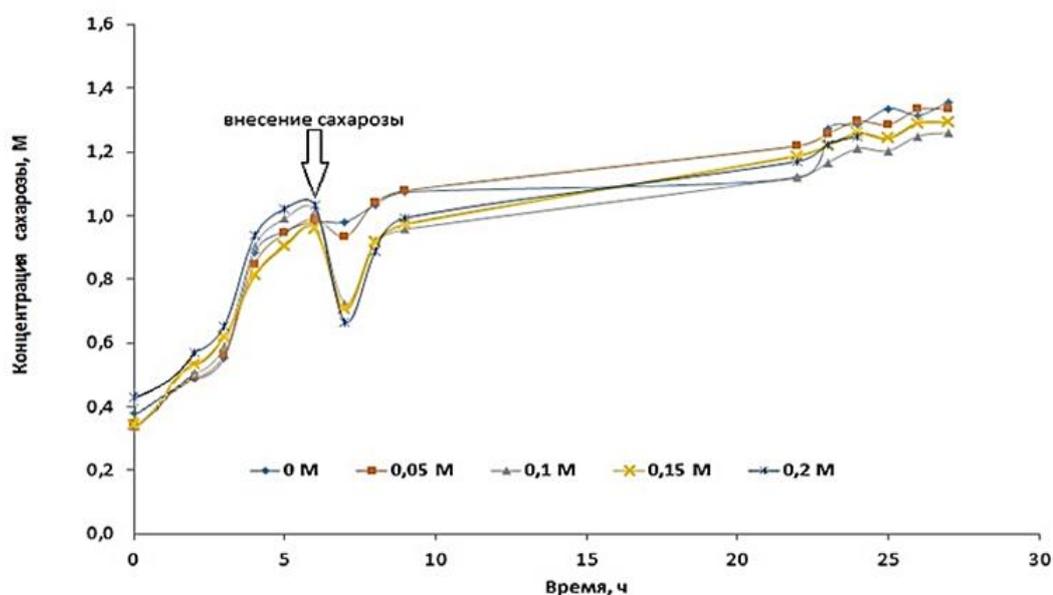
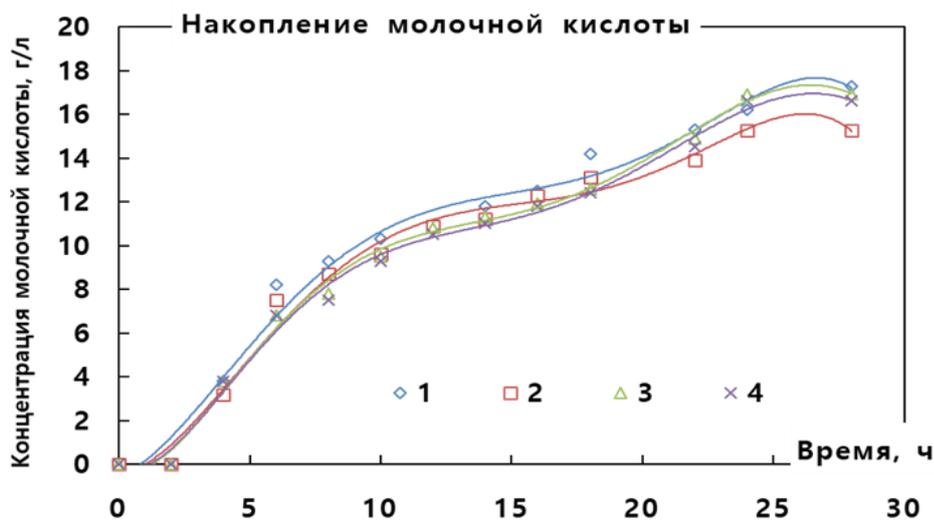
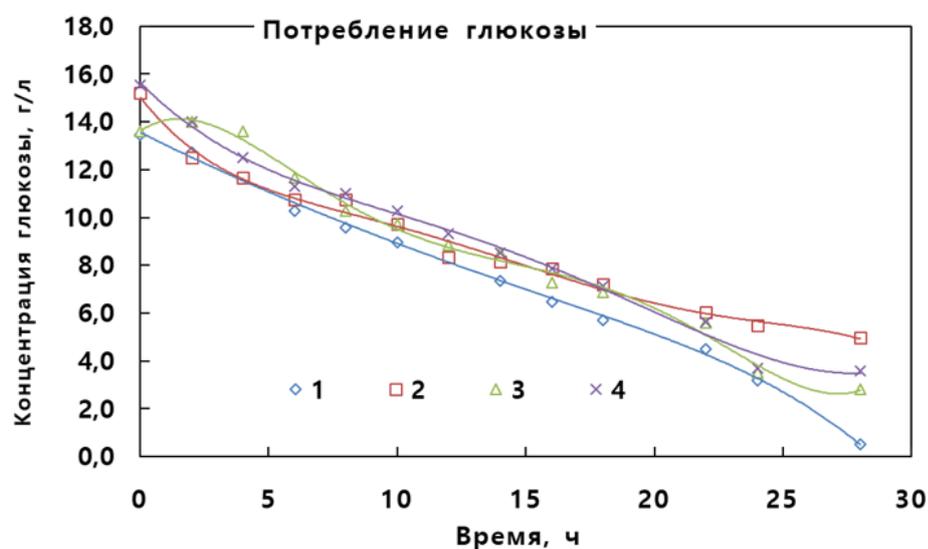


Рис.45. Кривые роста неадаптированной к стрессу линии *L. paracasei* (контроль) в вариантах с внесением сахарозы.

Из результатов, представленных на рис. 42-45, можно увидеть, что после внесения NaCl в концентрации 0,25 М и сахарозы в концентрации 0,15 М и 0,2 М наблюдается падение оптической плотности среды с биомассой. Однако в вариантах с линией, неадаптированной к оксидативному стрессу, это падение, в частности в варианте с внесением сахарозы, явно существеннее по сравнению с

адаптированной линией. Таким образом, адаптированная к стрессу линия явно устойчивее к осмотическому воздействию.

Во второй части исследований по влиянию осмотического стресса использовали в качестве стрессирующего агента раствор NaCl с концентрацией 0,2М. Проводилось параллельное культивирование в колбах Эрленмейера на свету (S) и в темноте (T) на среде MRS с содержанием 20 г/л глюкозы. Внесение 0,2 М NaCl проходило на конец 7-го часа культивирования. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 46.



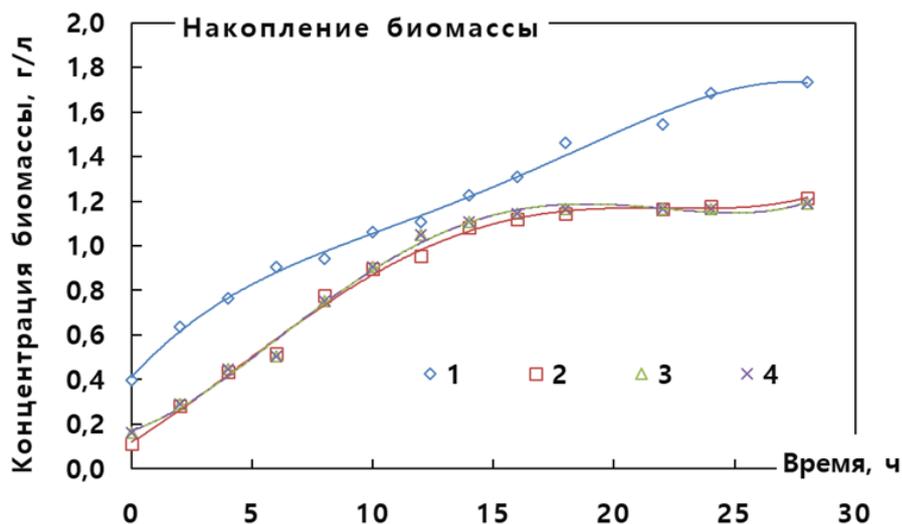


Рис. 46. Кривые потребления глюкозы, накопления молочной кислоты и биомассы при внесении 0,2 М NaCl на 7-ой час культивирования в среду с молочнокислыми бактериями, адаптированными и неадаптированными к оксидативному стрессу.

1. адаптированная к стрессу линия *L. paracasei* (инокулят 25 пассажа), освещение ферментационной среды.
2. адаптированная к стрессу линия *L. paracasei* (инокулят 25 пассажа), затемнение ферментационной среды.
3. неадаптированная к стрессу линия *L. paracasei* (контроль), освещение ферментационной среды.
4. неадаптированная к стрессу линия *L. paracasei* (контроль), затемнение ферментационной среды.

Повышенная концентрация биомассы линии 1 после засева ферментационной среды обусловлена изначально более высоким накоплением биомассы в инокуляте. Инокуляты готовились в тех же вариантах, что и при проведении основной ферментации в колбах.

Основываясь на результатах ферментации с внесением 0,2 М NaCl, представленных на рис. 46, можно отметить следующее:

- 1) При осмотическом стрессе в варианте 1 с адаптированной к пероксиду водорода линией *L. paracasei* В 4079 и освещением питательной среды выход продукта выше. Также существенно выше и уровень накопления биомассы по сравнению с вариантами 2-4;
- 2) Субстрат (глюкоза) расходуется практически полностью только при культивировании адаптированной к стрессу линии *L. paracasei* в условиях освещения среды и внесения 0,2 М NaCl (вариант 1).
- 3) Наибольшее количество неизрасходованного субстрата (глюкозы) отмечается для варианта 2 – при культивировании адаптированной к стрессу линии *L.*

paracasei в условиях затемнения среды.

- 4) Конечные концентрации молочной кислоты для вариантов 3 и 4 (контрольные неадаптированные к стрессу линии *L. paracasei* при культивировании как на свету, так и в темноте) сопоставимы и составляют 17,2 г/л и 16,9 г/л, соответственно, т.е. светочувствительность не проявляется.

Для оценки количества жизнеспособных клеток провели высев методом Коха (N – количество клеток на 1 мл суспензии) по окончании культивирования.

Таблица 14.

КОЕ/мл на конец культивирования (осмотическое стрессовое воздействие)

	Адаптированная культура, освещение.	Адаптированная культура, затемнение.	Неадаптированная культура, освещение.	Неадаптированная культура, затемнение.
N	$3,8 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^8$	$7,3 \times 10^9$	3×10^8

Наибольшее количество жизнеспособных клеток оказалось в варианте с адаптированной к пероксиду водорода линией лактобацилл, выращиваемых на свету.

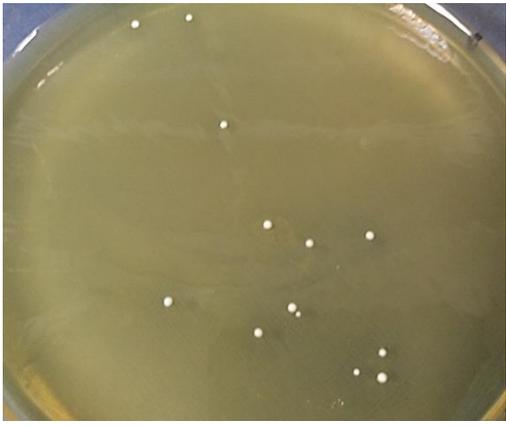
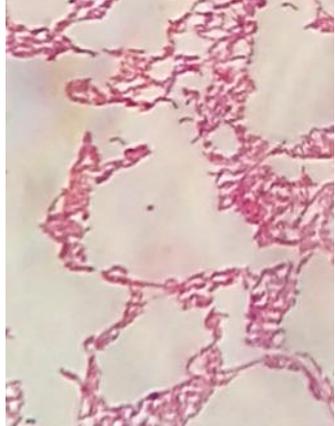
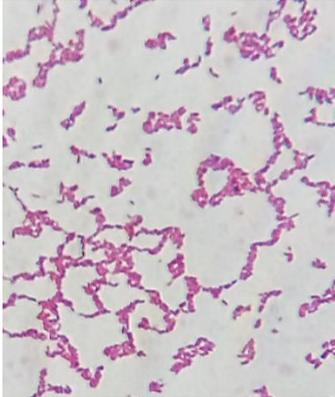
Таким образом, можно полагать, что культура молочнокислых бактерий *L. paracasei* В 4079, преадаптированная к стрессовому воздействию пероксида водорода, на свету становится более устойчивой и к сублетальному осмотическому воздействию, что свидетельствует о перекрестной адаптации в ответе на оксидативный и осмотический стрессы, при этом возникновение светочувствительности и положительное воздействие видимого света на показатели биосинтеза в наибольшей степени проявляется для бактерий, преаптированных к оксидативному стрессу.

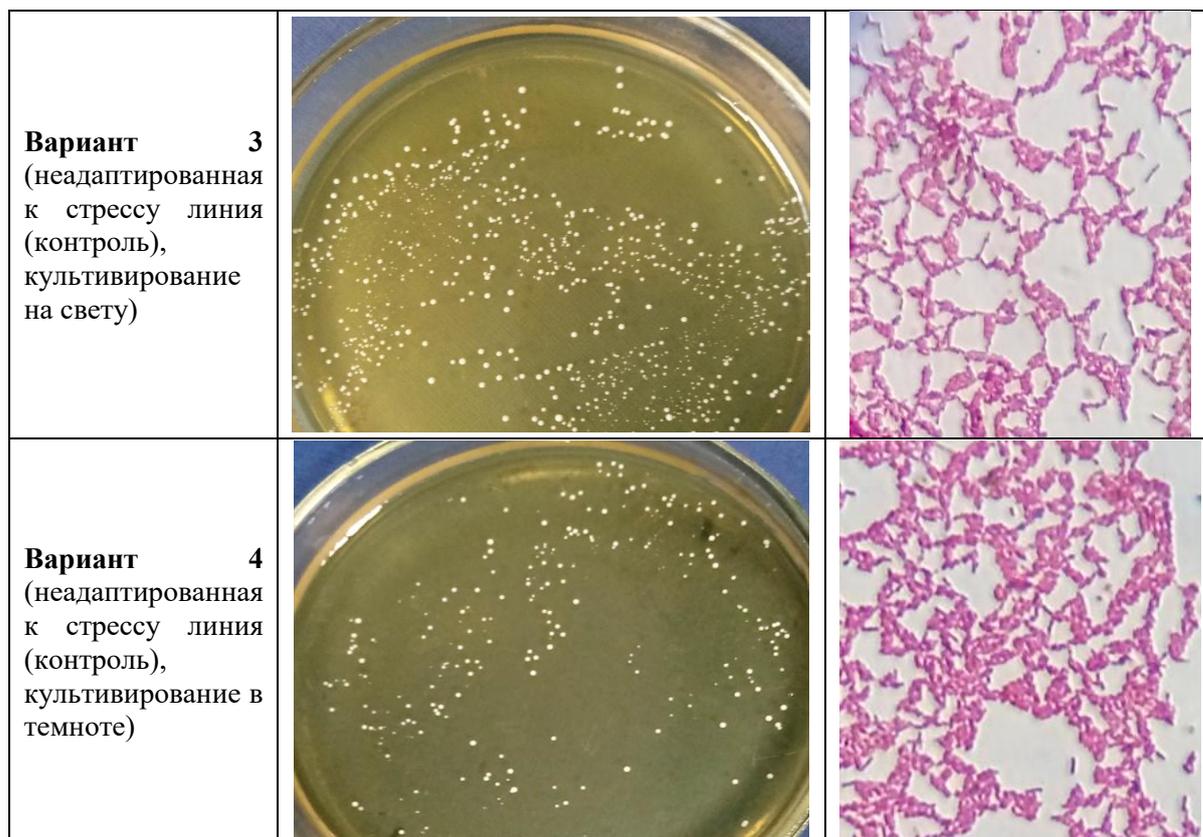
Клетки МКБ, подвергнутые оксидативному и осмотическому стрессу, были посеяны на агаризованную среду MRS. Фотографии КОЕ на чашках Петри (табл. 15) демонстрируют, что на конец культивирования для вариантов 2-4 происходит дифференциация культуры, заметно присутствие больших белых колоний и малых полупрозрачных. Затем выросшие на твердой среде клетки с больших и малых

колоний были пересеяны по отдельности в жидкую среду MRS, на 28-й час культивирования были отобраны пробы, которые затем вновь высевались на чашки Петри на агаризованную среду MRS. Дифференциации при этом обнаружено не было. Следовательно, при последовательном стрессовом воздействии (оксидативный стресс, затем осмотический стресс) обнаруживается дифференциация культуры, которая исчезает при снятии воздействия осмотического стресса, т.е. дифференциация обратима.

Таблица 15.

Фотографии колоний на чашке Петри и клеток адаптированной и неадаптированной к стрессовому воздействию линий молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* под микроскопом на конец культивирования с использованием и без использования освещения.

	Фото КОЕ на чашках Петри (28 час культивирования)	Иммерсионная микроскопия проб (28 час культивирования) увеличение 1000
Вариант 1 (адаптированная к стрессу линия, культивирование на свету)		
Вариант 2 (адаптированная к стрессу линия, культивирование в темноте)		



3.2.7. Культивирование молочнокислых бактерий *L. paracasei* в условиях кислотного стресса.

Аналогично экспериментам с осмотическим воздействием провели эксперименты с культивированием молочнокислых бактерий в условиях кислотного стресса. На рисунках 47-50 представлены кривые роста, потребления субстрата и накопления молочной кислоты в условиях кислотного стресса, который создавался снижением pH среды до 2,0 внесением HCl.

Сопоставление результатов, представленных на рис. 47-50 показывает, что во всех вариантах нет существенных отличий в потреблении глюкозы, накоплении биомассы, молочной кислоты. Таким образом, при воздействии оксидативного и кислотного стресса перекрестного ответа скорее всего не возникает, при этом разница между темновыми и световыми вариантами нивелируется.

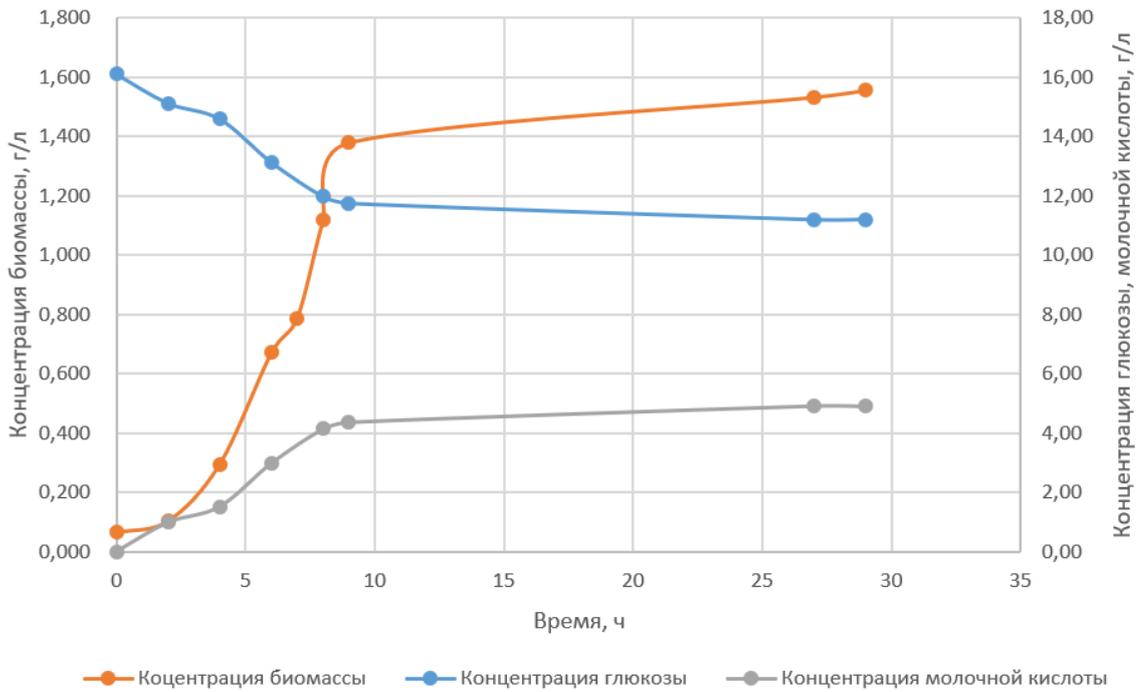


Рис. 47. Кривые роста, потребления глюкозы, накопления молочной кислоты для адаптированной к стрессу культуры *L. paracasei* при закислении среды и культивировании на свете.

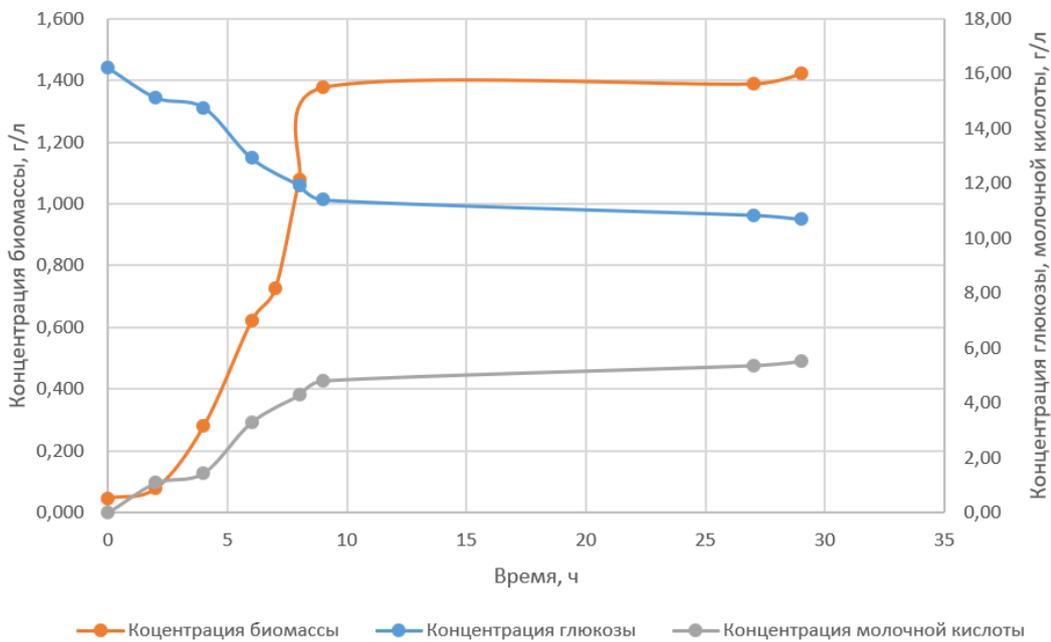


Рис. 48. Кривые роста, потребления глюкозы, накопления молочной кислоты для адаптированной к стрессу культуры *L. paracasei* при закислении среды и культивировании в темноте.

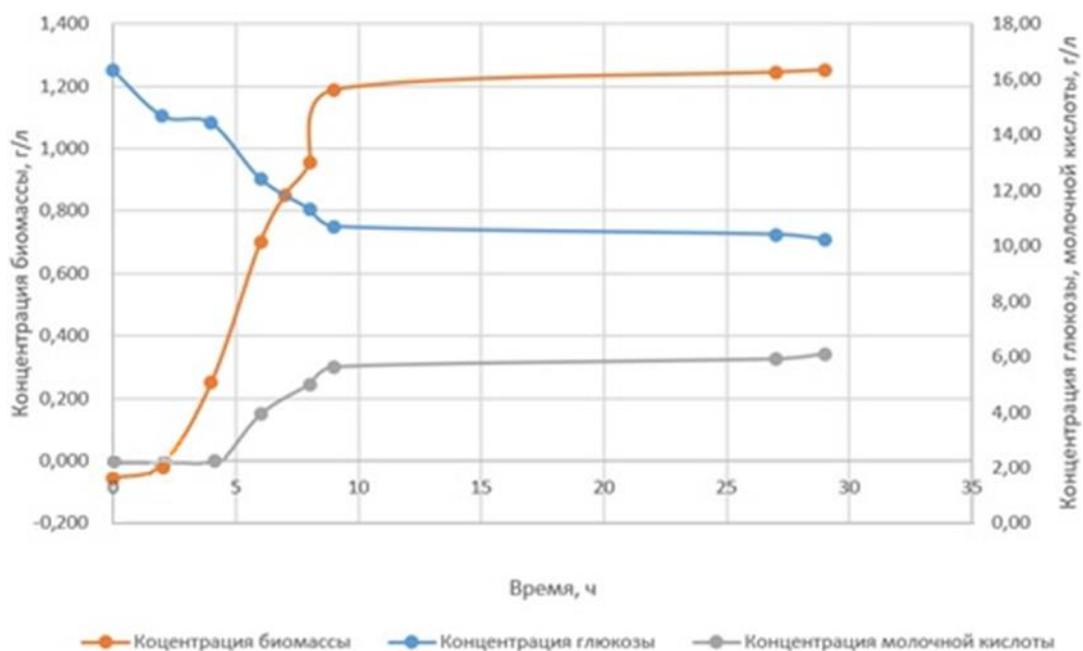


Рис. 49. Кривые роста, потребления глюкозы, накопления молочной кислоты для неадаптированной к стрессу культуры *L. paracasei* при закислении среды и культивировании на свету.

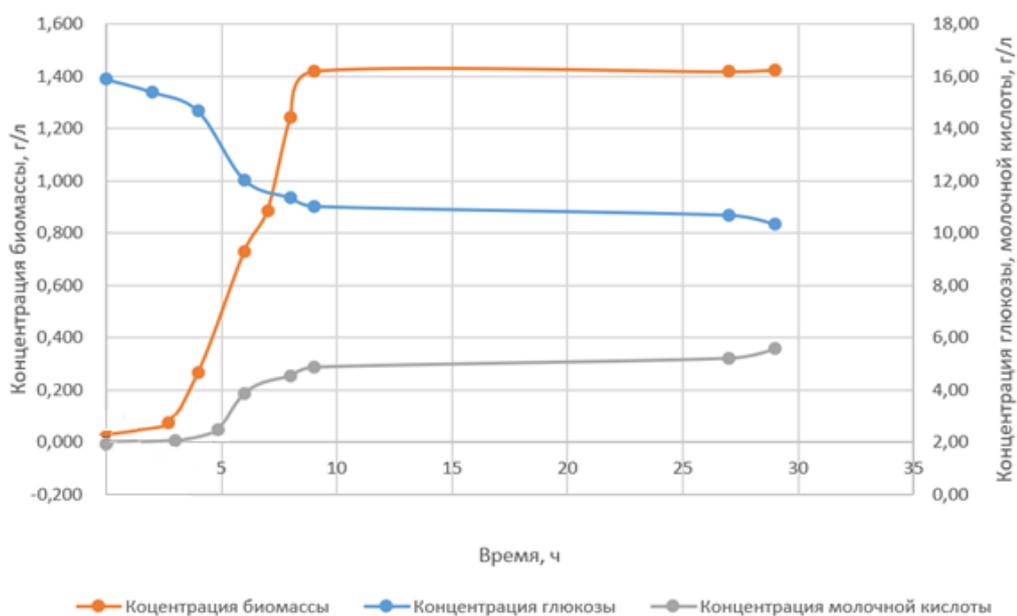


Рис. 50. Кривые роста, потребления глюкозы, накопления молочной кислоты для неадаптированной к стрессу культуры *L. paracasei* при закислении среды и культивировании в темноте.

3.2.8. Исследование внутриклеточного пула белков стрессированной и нестрессированной культур МКБ.

Задачей заключительного этапа исследований являлось сопоставление изменений во внутриклеточном пуле белков в линиях МКБ, адаптированных к окислительному воздействию пероксида водорода, а также подвергнутых воздействию теплового и осмотического шока, по сравнению с нестрессированной линией.

Пробы, отобранные в ходе культивирования в стрессовых условиях, подвергались лизису. В полученных лизатах при помощи биуретового метода измерялась концентрация внутриклеточного белка, которая составляла от 30 до 50 мг/мл, и далее проводилась оценка состава белков внутриклеточного пула лактобацилл при помощи электрофореза в SDS-ПААГ.

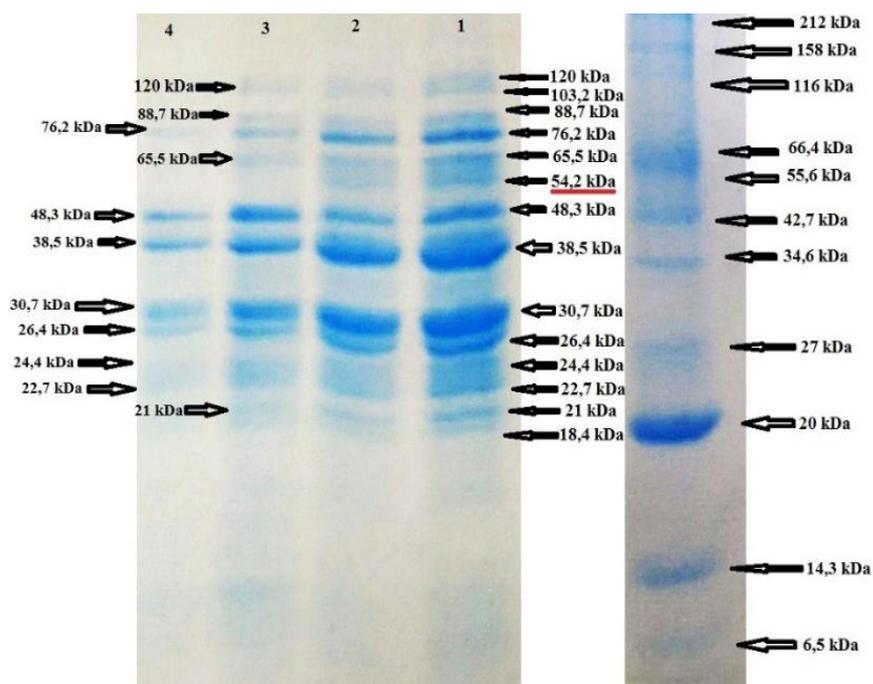


Рис. 51. Электрофореграмма внутриклеточного пула белков лактобацилл (окислительный стресс).

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

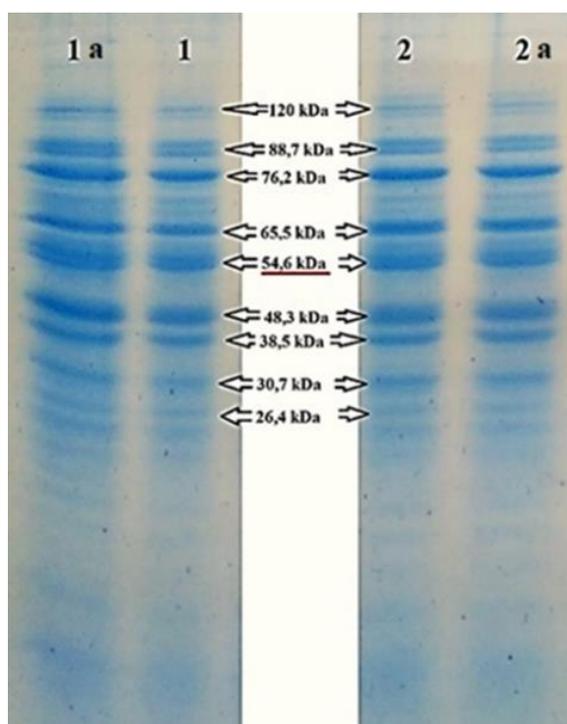


Рис. 52. Электрофореграмма внутриклеточного пула белков лактобацилл (тепловой и осмотический шок).

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

На рис. 51, 52 приведены 2 из полученных электрофореграмм. Видно, что для всех образцов, вне зависимости от условий культивирования, во внутриклеточном пуле присутствуют белки, имеющие молекулярную массу 120, 88.7, 76.2, 65.5 48.3, 30.7, 26.4, 22.7 и 21 кДа. 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 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.

Резюмируя данные по исследованию перекрестной адаптации, можно отметить следующее:

- у исследуемой культуры лактобацилл *L. paracasei* В 4079 возникает перекрестный ответ на оксидативный стресс и тепловой шок;

- между оксидативным стрессом и голоданием перекрестного ответа вероятнее всего не возникает;

- между оксидативным стрессом и осмотическим стрессом перекрестный ответ наблюдается;

- возникновение светочувствительности наблюдается только для культуры, подверженной стрессорному воздействию.

Применительно к управляемому культивированию молочнокислых бактерий можно заключить, что их популяция, преадаптированная к оксидативному воздействию в условиях освещения ферментационной среды, обладая более высокими целевыми показателями биосинтеза, будет более устойчивой к сублетальным воздействиям температуры и осмотическому воздействию. Последнее, в частности, может иметь технологическое значение в процессе сушки при получении препаратов на основе живых клеток молочнокислых бактерий. Возникновение именно такого сочетания перекрестной адаптации к стрессовым воздействиям можно объяснить, если учесть экологические условия обитания молочнокислых бактерий, а именно в одной из экологических ниш – на поверхности растений (в эпифитной зоне). В такой природной экологической нише бактерии регулярно подвергаются воздействию солнечного света, сопровождаемого локальным нагревом поверхности и иссушением среды обитания, т.е. именно здесь преимущество получают те молочнокислые бактерии, которые могут использовать свет (фоторепарацию) для устранения повреждающих воздействий АФК, и одновременно устойчивые к тепловому и осмотическому воздействию. Условия голодания и закисления среды не являются отличительными признаками эпифитной зоны растений по сравнению с другими экологическими нишами.

По результатам исследований можно сделать следующие рекомендации для совершенствования процесса ферментации с получением молочной кислоты.

- 1) Оптимальный состав питательной среды: концентрация глюкозы 100 г/л (для биореактора) 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.
- 2) Для получения молочной кислоты возможно использование свекловичной мелассы, однако продуктивность процесса в этом случае снижается в 5 раз по сравнению с культивированием на глюкозе. Предварительная стадия гидролиза мелассы позволяет повысить продуктивность периодического процесса до 4,7 г/л*ч, степень конверсии углеводов при этом сопоставима с показателями, достигаемыми при использовании глюкозы.
- 3) Дрожжевой экстракт может быть заменен более дешевыми источниками азота и ростовых факторов – соевыми гидролизатами при показателях выхода молочной кислоты и продуктивности лишь на 10-30% ниже по сравнению с базовым вариантом (с использованием дрожжевого экстракта), что свидетельствует о возможности использования данных источников азота в составе комплексных сред для получения молочной кислоты и снижения ее себестоимости.
- 4) Оптимальное стрессовое воздействие малых доз пероксида водорода с одновременным освещением видимым светом ферментационной среды с преадаптированными к оксидативному стрессу молочнокислыми бактериями может повысить выход молочной кислоты на 2–5%, снизить содержание побочных внеклеточных продуктов метаболизма, повысить устойчивость процессов культивирования при отклонении технологических параметров от оптимальных, например, при нарушении температурного режима в пределах субкритических значений.

4. 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 при снижении показателей выхода молочной кислоты и продуктивности лишь на 10-30%.
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 (40-400 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, с повышением выхода молочной кислоты на 2-5%, снижением содержания побочных продуктов биосинтеза и остаточных компонентов питания, что важно в случае дальнейшего 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. Исследование белкового профиля в условиях оксидативного стресса, осмотического шока и теплового шока у адаптированной и неадаптированной к оксидативному стрессу культуры выявило наличие белка 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.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Hofvendahl, K. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources / K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal // *Enzyme Microb. Technol.* - 2000. - Vol. 26. - 87-107 pp.
2. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y. and Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes / *Biotechnol. Adv.* - 2013. - Vol. 31. - 877 – 902 pp.
3. R. Datta, Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies—a review / Datta R., Henry M. J. // *Chem. Technol. Biotechnol.* – 2006. - №, 81. - 1119–1129 pp.
4. Kleerebezem, R. Mixed culture biotechnology for bioenergy production / R. Kleerebezem, M.C.M. van Loosdrecht // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2007. - Vol.18. - 207–212 pp.
5. Nancib, A. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* / A. Nancib, N. Nancib, J. Boudrant // *World J. Microbiol. Biotechnol.* - 2009. - Vol.25. - 1423–1429 pp.
6. Okano, K. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits / K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. - Vol.85. - 413–423 pp.
7. Reddy, G. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review / Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., et al. // *Biotechnol. Adv.* 2008. - Vol. 26. - 22-34 pp.
8. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology // *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker 2004. - 1- 66 pp.
9. Pedersen, M.B. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses on biotechnology / M.B. Pedersen, , P. Caudu, D. Lechardeur et al. // *Ann. Rev. in F. Science and Technol.* – 2012. - Vol. 3., is.1. - 37-58 pp.

10. Zotta T., Ricciardi A., Ianniello R.G., Parente E., Reale A., Rossi F., Iacumin L., Comi G., Coppola R. Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group. / PLOS one. – 2014. - Vol. 9., is 6. - e99189.
11. Ricciardi, A. Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups / A. Ricciardi, R.G. Ianniello, E. Parente, T. Zotta // J. Appl. Microbiol. - 2015 – Vol. 119., is.3. - 776-785 pp.
12. Hammes W., Hertel C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*: The Prokaryotes. Springer New York. 2006. 320–403 pp.
13. Tashiro, Y. Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Tashiro, A. Inagaki, M. Shimizu et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2011 - Vol.75. - 605–607 pp.
14. Jin, B. *Rhizopus arrhizus*— a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L-(+)-lactic acid./ B Jin, L.P. Huang, P. Lant // Biotechnol Lett. – 2003 - Vol.25. - 1983–1987 pp.
15. Bulut, S. Effect of different carbon sources on L-(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* / S. Bulut, M. Elibol, D. Ozer // Biochem. Eng. J. - 2004. - Vol. 21. - 33–37 pp.
16. Marták, J. Fermentation for lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation / J. Marták, S. Schlosser, E Sabolová et al. // Process. Biochem. – 2003. - Vol. 38. - 1573–83 pp.
17. Oda, Y. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition / Y. Oda, Y. Yajima, M. Kinoshita et al. // Food Microbiol. – 2003. - Vol.20. - 371–375 pp.
18. Zhang , Z. Y. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus Fungi* / Z. Y. Zhang, B. Jin, J.M. Kelly // Biochem. Eng. J. – 2007. – Vol. 35. - 251–263 pp.
19. Maas, R.H. Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae* / R. H. Maas, R. R. Bakker, G. Eggink et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2006. - Vol. 72. - 861–868 pp.

20. Maas, R. H. Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L-(+)-lactic acid production / R. H. Maas, J. Springer, G. Eggink et al. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* - 2008b. - Vol. 35. - 569–578 pp.
21. Miura, S. Production of L-lactic acid from corncob / S. Miura, T. Arimura, N. Itoda et al. // *J. Biosci. Bioeng.* - 2004. - Vol.97. - 153–157 pp.
22. Park E. Y. Bioconversion of waste office paper to L-(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae* / E. Y. Park, P. N. Anh, N. Okuda // *Bioresour. Technol.* – 2004. - Vol. 93. - 77–83 pp.
23. Efremenko, E. *Rhizopus oryzae* fungus cells producing L(+)-lactic acid: kinetic and metabolic parameters of free and PVA-cryogel-entrapped mycelium / E. Efremenko, O. Spiricheva, S. Varfolomeyev et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 72. – 480 – 485 pp.
24. Taskin M. Efficient production of L-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61 / M. Taskin, N. Esim, S. Ortucu // *Food Bioprod. Process.* – 2012. - Vol. 90. - 773–779 pp.
25. Thongchul N. Controlling biofilm growth and lactic acid production by *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor: effects of dissolved oxygen, rotational speed, and urea concentration // N. Thongchul, S.T. Yang // *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* - 2006. - Vol. 37. - 1-13 pp.
26. Litchfield, J. H. Lactic acid, microbially produced. *Encyclopedia of microbiology.* Oxford: Academic Press. - 2009. - 362–372 pp.
27. Vink, E. T. H. The eco-profile for current Ingeo polylactide production / E. T. H. Vink, S. Davies, J.J. Kolstad // *Ind. Biotechnol.* – Vol. 6, №1. – 212-224 pp.
28. Liu, T. Scale-up of L-Lactic acid production by mutant strain *Rhizopus sp.* Mk-96-1196 from 0,003 m³ to 5 m³ in airlift bioreactors / T. Liu, S. Miura, M. Yaguchi et al. // *J. Biosci. Bioeng.* - 2006a. - Vol. 101. - 9-12 pp.
29. Liu, Y. Optimization of L-(+)-lactic acid production using pelletized filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395 / Y. Liu, W. Liao, C. Liu et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 2006b. - Vol. 131. - 844 – 853 pp.

30. Wang, Q. Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium / Q. Wang, X. Zhao, J. Chamu et al. // *Bioresour. Technol.* - 2011b. - Vol. 102 - 8152 – 8158 pp.
31. Meng, Y. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus sp.* WL-S20 / Y. Meng, Y. Xue, B. Yu et al. // *Bioresour. Technol.* – 2012. - Vol. 116. - 334–339 pp.
32. Maas, R. H. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate / R. H. Maas, R. R. Bakker, M. L. Jansen et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2008a. - Vol. 78. - 751–758 pp.
33. Ou, M.S. L-(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans* / M.S. Ou, L. O. Ingram, K. T. Shanmugam // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. - Vol. 38. - 599–605 pp.
34. Patel, M. A. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid / M. A. Patel, M. S. Ou, R. Harbrucker et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2006. - Vol. 72. - 3228–3323 pp.
35. Qin, J. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus sp.* 2-6 / J. Qin, B. Zhao, X. Wang et al. // *PLoS. One.* – 2009. - Vol. 4. - P. 4359.
36. Zhao, B. Repeated open fermentative production of optically pure L-lactic acid using a thermophilic *Bacillus sp.* strain / B. Zhao, L. Wang, C. Ma et al. // *Bioresour. Technol.* - 2010b. - Vol. 101. - 6494–6498 pp.
37. Ou, M.S. Thermophilic *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalysts / M.S. Ou, N. Mohammed, L.O. Ingram et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 2009. - Vol. 155. - 379–85 pp.
38. Rosenberg, M. High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats / M. Rosenberg, M. Rebros, L. Kristofikova et al. // *Biotechnol. Lett.* – 2005. - Vol. 27. - 1943–9417 pp.

- 39.Sakai, K. Open L-lactic acid fermentation of food refuse using thermophilic *Bacillus coagulans* and fluorescence in situ hybridization analysis of microflora / K. Sakai, Y. Ezaki // J. Biosci. Bioeng. – 2006. - Vol. 101. - 457–463 pp.
- 40.Sakai, K. Thermotolerant *Bacillus licheniformis* TY7 produces optically active L-lactic acid from kitchen refuse under open condition / K. Sakai, T. Yamanami // J. Biosci. Bioeng. - 2006. - Vol. 102. - 132–134 pp.
- 41.Clark, D. P. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. – 1989. - Vol. 63. - 223–234 pp.
42. De Graef, M.R. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli* / M.R. de Graef, S. Alexeeva, J. L. Snoep et al. // J. Bacteriol. – 1999. - Vol. 181. - 2351–2357 pp.
- 43.Zhou, S. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110 / S. Zhou, T. B. Causey, A. Hasona // Appl. Environ. Microbiol. - 2003a. - Vol. 69. - 399–407 pp.
- 44.Chang, D. E. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1 / D. E. Chang, H. C. Jung, J. S. Rhee et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. - Vol. 65. - 1384-13138 pp.
45. Kochhar, S. Cloning and overexpression of *Lactobacillus helveticus* D-lactate dehydrogenase gene in *Escherichia coli* / S. Kochhar, H. Hottinger, N. Chuard et al. // Eur. J. Biochem. - 1992. - Vol. 208. - 799–805 pp.
46. Taguchi, H. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum*: D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid-dehydrogenase family / H. Taguchi, T. Ohta // J. Biol. Chem. – 1991. - Vol. 266. - 12588–12594 pp.
- 47.Dien, B. S. Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars / B. S. Dien, N. N. Nichols, R. J. Bothast // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - Vol. 27. - P. 259–264.

48. Zhu, Y. Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains / Y. Zhu, M. A. Eiteman, K. DeWitt et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2007. - Vol. 73. - 456–464 pp.
49. Zhou, S. Functional replacement of the *Escherichia coli* 2325D(-)-Lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-Lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici* / S. Zhou, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2003b. - Vol. 69. - 2237–2244 pp.
50. Zhou, S. Fermentation of 10% (w/v) sugar to D-lactate by engineered *Escherichia coli* / S. Zhou, L. P. Yomano, K. T. Shanmugam et al. // *Biotechnol. Lett.* – 2005. - Vol. 27. - 1891–1896 pp.
51. Wang, Y. Homofermentative production of D-lactic acid from sucrose by a metabolically engineered *Escherichia coli* / Y. Wang, T. Tian, J. Zhao et al. // *Biotechnol. Lett.* - 2012. - Vol. 34. - 2069–2075 pp.
52. Mazumdar, S. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol / S. Mazumdar, J. M. Clomburg, R. Gonzalez // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2010. - Vol. 76. - 4327–4336 pp.
53. Portnoy V.A. Fermentation of D-glucose by an evolved cytochrome oxidase-deficient *Escherichia coli* strain / V.A. Portnoy, M. J. Herrgard, B. O. Palsson // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2008. - Vol. 74. - 7561–7569 pp.
54. Yukawa, H. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain / H. Yukawa, C. A. Omumasaba, H. Nonaka et al. // *R. Microbiol.* - 2007. - Vol. 153. - 1042–1058 pp.
55. Kawaguchi, H. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum* / H. Kawaguchi, M. Sasaki, A. A. Vertès et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2008. - Vol. 77. - 1053–1062 pp.
56. Kawaguchi, H. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum* / H. Kawaguchi, A. A. Vertès, S. Okino et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2006. - Vol. 72. - 3418–3428 pp.
57. Sasaki M. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions / M.

- Sasaki, T. Jojima, M. Inui et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - Vol. 81. - 691–699 pp.
- 58.Sasaki, M. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars / M. Sasaki, T. Jojima, H. Kawaguchi et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2009. - Vol. 85. - 105–115 pp.
- 59.Jia, X. D-Lactic acid production by a genetically engineered strain *Corynebacterium glutamicum* / X. Jia, P. Liu, S. Li et al. // World. J. Microbiol. Biotechnol. 2011. - Vol. 27. - 2117–2124 pp.
- 60.Inui, M. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions / M. Inui, S. Murakami, S. Okino et al. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. - 2004. - Vol. 7. - 182–196 pp.
- 61.Okino S, Inui M, Yukawa H. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation / S. Okino, M. Inui, H. Yukawa // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2005. - Vol. 68. - 475–480 pp.
- 62.Song, Y. Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production / Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2012. - Vol. 93. - 1917–1925 pp.
- 63.Abdel-Rahman, M. A. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits / M. A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto // J. Biotechnol. - 2011c. - Vol. 156. - 286–301 pp.
- 64.Abdel-Rahman, M. A. Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium *Enterococcus mundtii* QU 25 / M. A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, T. Zendo et al. // Appl. Environ. Microbiol. - 2011a. - Vol. 77. - 1892–1895 pp.
- 65.Okano, K. Homo D-lactic acid fermentation from arabinose by redirection of phosphoketolase pathway to pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum* / K. Okano, S. Yoshida, T. Tanaka et al. // Appl. Environ. Microbiol. - 2009a. - Vol. 75. - 5175–5178 pp.
- 66.Okano, K. Improved production of homo-D-lactic acid via xylose fermentation by introduction of xylose assimilation genes and redirection of the phosphoketolase

- pathway to pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum* / K. Okano, S. Yoshida, R. Yamada et al. // Appl. Environ. Microbiol. - 2009b. - Vol. 75. - 7858–7861 pp.
67. Hofvendahl, K. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources / K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal // Enzyme Microb. Technol. - 2000. - Vol. 26. - 87-107 pp.
68. Gonzalez, R. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli* / R. Gonzalez, A. Murarka, Y. Dharmadi et al. // Metab. Eng. - 2008. - Vol. 10. - 234–245 pp.
69. Kadam, S. R. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production / S. R. Kadam, S. S. Patil, K. B. Bastawde et al. // Process Biochem. - 2006. - Vol. 41. - 120–126 pp.
70. Yun, J. S. Production of optically pure L-(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1 / J. S. Yun, Y. J. Wee, H. W. Ryu // Enzyme Microb. Technol. - 2003. - Vol. 33. - 416–423 pp.
71. Moon, S. K. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* CHB2121 / S. K. Moon, Y. J. Wee, G. W. Choi // J. Biosci. Bioeng. - 2012. - Vol. 114. - 155–159 pp.
72. Lee, J. Control of fed-batch fermentations / J. Lee, S.Y. Lee, S. Park et al. // Biotechnol. Adv. - 1999. - Vol. 17. - 29–48 pp.
73. Garlotta, D. A literature review of poly (lactic acid) / D. Garlotta // J. Polym. Environ. – Vol. 9, №2. – 63-84 pp.
74. Lee, J. Control of fed-batch fermentations / J. Lee, S.Y. Lee, S. Park et al. // Biotechnol. Adv. - 1999. - Vol. 17. - 29–48 pp.
75. Okino, S. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation / S. Okino, M. Suda, K. Fujikura et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - Vol. 78. - 449–454 pp.
76. Ge, X. Y. Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus sp.* / X.Y. Ge, H. Qian, W. G. Zhang // Bioresour. Technol. - 2009. - Vol. 100. - 1872–1874 pp.

77. Ge X. Y. Enhancement of L-lactic acid production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem artichoke tubers by kinetic optimization and citrate metabolism / X. Y. Ge, H. Qian, W. G. Zhang // J. Microbiol. Biotechnol. - 2010. - Vol. 20. - 101–109 pp.
78. Wang, Q. Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium / Q. Wang, X. Zhao, J. Chamu et al. // Bioresour. Technol. - 2011b. - Vol. 102. - 8152–8158 pp.
79. Ding, S. L-Lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies / S. Ding, T. Tan // Process. Biochem. - 2006. - Vol. 41. - 1451–1454 pp.
80. Bai D. M. Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid / D. M. Bai, Q. Wei, Z. H. Yan et al. // Biotechnol. Lett. - 2003b. - Vol. 25. - 1833–1835 pp.
81. Zhang, Y. Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in lactic acid production. / Y. Zhang, W. Cong, S. Shi // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2010. - Vol. 162. - 2149–2156 pp.
82. Li, Z. Improvement of L-lactic acid production under glucose feedback controlled culture by *Lactobacillus rhamnosus* / Z. Li, J. Lu, L. Zhao et al. // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2010. - Vol. 162. - 1762–1767 pp.
83. Maas, R.H. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate / R.H. Maas, R. R. Bakker, M.L. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2008a. –Vol. 78. - 751–758 pp.
84. Romani, A. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges / A. Romani, R. Yanez, G. Garrote et al. // Bioresour. Technol. – 2008. – Vol. 99. - 4247–4254 pp.
85. Wang, L. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus sp.* CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal / L. Wang, B. Zhao, F. Li et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2011a. – Vol. 89. - 1009–1017 pp.
86. Ou, M.S. L-(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans* // M.S. Ou, L.O. Ingram, K.T. Shanmugam // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 38. - P.599–605.

87. Ge, X.Y. Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus sp.* / X. Y. Ge, H. Qian, W. G. Zhang // *Bioresour. Technol.* – 2009. – Vol. 100. - 1872–1874 pp.
88. Zhao, B. Repeated open fermentative production of optically pure L-lactic acid using a thermophilic *Bacillus sp.* Strain // B. Zhao, L. Wang, C. Ma et al. // *Bioresour. Technol.* - 2010b. – Vol. 101. - 6494–6498 pp.
89. Kim, H. O. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus sp.* RKY2 / H.O. Kim, Y.J. Wee, J.N. Kim et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 131. – 694–704 pp.
90. Wee, Y. J. Batch and repeated batch production of L-(+)-lactic acid by RKY1 using wood hydrolysate and corn steep liquor *Enterococcus faecalis* / Y. J. Wee, J. S. Yun, D. Kim et al. // *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 33. – 431–435 pp.
91. Yin, P.M. L-(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor / P. M. Yin, K. Yahiro, T. Ishigaki et al. // *J. Ferment. Bioeng.* – 1998. – Vol. 85. - 96-100 pp.
92. Du J.X., Cao N.J., Gong C.S. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermentor / *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1998. Vol.70. – 323–329 pp.
93. Bai, D. M. L-(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor / D. M. Bai, M. Z. Jia, X. M. Zhao et al. // *Chem. Eng. Sci.* - 2003a. – Vol.58. -785–791 pp.
94. Yu, M. C. Enhanced production of L-(+)-lactic acid by floc-form culture of *Rhizopus oryzae* / M. C. Yu, R. C. Wang, C. Y. Wang et al. // *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* – 2007. – Vol.38. - 223–228 pp.
95. Liu Y., Liao W., Chen S. Co-production of lactic acid and chitin using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* cultured on cull potatoes and glucose / *J. Appl. Microbiol.* – 2008. – Vol. 105. - 1521–1528 pp.
96. Wu, X. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor / X. Wu, S. Jiang, M. Liu et al. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 38. - 565–571 pp.

97. Øyaas, J. Uptake of lactose and continuous lactic acid fermentation by entrapped non-growing *Lactobacillus helveticus* in whey permeate / J. Øyaas, I. Storrø, D.W. Levine // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1996. - Vol. 46. - 240–249 pp.
98. Panesar, P. S. Bioutilisation of whey for lactic acid production / P. S. Panesar, J. F. Kennedy, D.N Gandhi et al. // *Food Chem.* - 2007. - Vol. 105. - 1-14 pp.
99. Kossevaa, M. R. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey International / M. R. Kossevaa, P. P. Panesar, G. Kaur et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2009. - Vol. 45. - 437–447 pp.
100. Kourkoutas, Y. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review / Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I.M. Banat, R. Marchant et al. // *Food. Microbiol.* - 2004. - Vol. 21. - 377–397 pp.
101. Pilkington, P. H. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. / P. H. Pilkington, A. Margaritis, N. A. Mensour et al. // *J. Inst. Brew.* - 1998. - Vol. 104. - 19–31 pp.
102. Goncalves, L. M. D. Inert supports for lactic acid fermentation a technological assessment / L. M. D. Goncalves, M. T. O. Barreto, A. M. R. B. Xavier et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1992. - Vol. 38. - 305–311 pp.
103. Kosseva, M. R. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey / M. R. Kosseva, P. S. Panesar, J. F. Kennedy, et al. // *Internat. J. of Biol. Macromol.* - 2009. - Vol. 45, is.5. - 437- 447 pp.
104. Andrews G. F. A fluidized-bed continuous bioreactor for lactic acid production / G. F. Andrews, J. P. Fonta // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 1989. - Vol. 20. - 375–390 pp.
105. Tango M. S. A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus* / M. S. Tango, A. E. Ghaly // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2002. - Vol. 58. - 712–720 pp.
106. Guoqiang D. Immobilization of *Lactobacillus casei* cells to ceramic material pretreated with polyethylenimine / D. Guoqiang, R. Kaul, B. Mattiasson // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1992. - Vol. 37. - 305–310 pp.

107. Krischke W. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei subsp. casei* / W. Krischke, M. Schroder, W. Trosch // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1991. - Vol. 34. - 573–578 pp.
108. Velázquez A. C. Evaluation of plastic-composite supports in repeated fed-batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* // A. C. Velázquez, A. L. Pometto III, K. L. Ho et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - Vol. 55. - 434–441 pp.
109. Elezi O. Food additive lactic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus brevis* on delignified cellulosic material / O. Elezi, Y. Kourkoutas, A. A. Koutinas et al. // J. Agric. Food Chem. - 2003. - Vol. 51. - 5285–5289 pp.
110. Lee K. W. Structural observation of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by optical and scanning electron microscopy / K. W. Lee, S. C. Baick, W. H. Chung et al. // Food Sci. Biotechnol. - 2003. - Vol. 12. - 13–17 pp.
111. Park J. K. Microencapsulation of microbial cells / J. K. Park, H. N. Chang // Biotechnol. Adv. - 2000. - Vol. 18. - 303–319 pp.
112. Tanaka H. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix / H. Tanaka, S. Irie, H. Ochi // J. Ferment. Bioeng. - 1989. - Vol. 68. - 216–219 pp.
113. Sun, Y. Stability of immobilized *R. oryzae* in repetitive batch productions of L-(+)-lactic acid: effect of inorganic salts / Y. Sun, Y. L. Li, S. Bai et al. // Bioprocess. Eng. - 1998. - Vol. 19. - 155–157 pp.
114. Ogbonna J. C. Production of microgel beads by a rotating disc atomizer / J. C. Ogbonna, M. Matsumura, T. Yamagata et al. // J. Ferment. Bioeng. - 1989. - Vol. 68. - 40–48 pp.
115. Chang H. N. Multistage high cell continuous fermentation for high productivity and titer / H. N. Chang, N. J. Kim, J. Kang et al. // Bioprocess. Biosyst. Eng. - 2011. - Vol. 34. - 419–431 pp.
116. Jin, Y. L. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* / Y. L. Jin, R.A. Speers // Food. Res. Int. - 1998. - Vol. 31. - 421–440 pp.

117. Ganguly, R. Production of lactic acid with loofa sponge1 immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10 / R. Ganguly, P. Dwivedi, R. P. Singh // Bioresour. Technol. - 2007. - Vol. 98. - 1246–1251 pp.
118. Lin, J. P. Mathematical model of L-lactic acid fermentation in a RDC coupled with product separation by ion exchange / J. P. Lin, S. D. Ruan, P. L. Cen // Chem. Eng. Commun. - 1998. - Vol. 168. - 59–79 pp.
119. Park E. Y. Efficient production of L-(+)-Lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor / E. Y. Park, Y. Kosakai, M. Okabe // Biotechnol. Prog. - 1998. - Vol. 14. - 699–704 pp.
120. Tamada, M. Production of L-(+)-lactic acid by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* with polymer supports prepared by gamma-ray-induced polymerization / M. Tamada, A. A. Begum, S. Sadi // J. Ferment. Bioeng. - 1992. - Vol. 74. - 379–383 pp.
121. Tay, A. Production of L-(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor / A. Tay, S. T. Yang // Biotechnol. Bioeng. - 2002. - Vol. 80. - 1-12 pp.
122. Hamamci, H. Production of L-(+)-lactic acid and using immobilized *Rhizopus oryzae*, reactor performance based on kinetic model simulation / H. Hamamci, D. D. Ryu // Appl. Biochem. Biotechnol. - 1994. - Vol. 44. - 125–133 pp.
123. Xuemei, L. L-Lactic acid production using immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized-bed with simultaneous product separation by electro dialysis / L. Xuemei, L. Jianping, L. Moe et al. // Bioprocess. Eng. 1999. - Vol. 20. - 230–237 pp.
124. Kosakai Y. Enhancement of L-lactic acid production using mycelial flocs of *Rhizopus oryzae* / Y. Kosakai, Y. S. Park, M. Okabe // Biotechnol. Bioeng. - 1997. - Vol. 55. - 461–470 pp.
125. Tay A, Yang ST. Production of L-(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor / A. Tay, S. T. Yang // Biotechnol. Bioeng. - 2002. - Vol. 80. - 1-12 pp.
126. Chotisubha-Anandha, N. Improved oxygen transfer and increased L-lactic acid production by morphology control of *Rhizopus oryzae* in a static bed bioreactor / N.

- Chotisubha-Anandha, S. Thitiprasert, V. Tolieng et al. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* - 2011. - Vol. 34. - 163–172 pp.
127. John, R. P. Co-culturing of *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* with a *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* mutant to make high cell density for increased lactate productivity from cassava bagasse hydrolysate / R. P. John, K. M. Nampoothiri // *Curr. Microbiol.* - 2011. - Vol. 62. - 790–794 pp.
128. Yamane, T. Highly accumulative production of L-(+)-lactate from glucose by crystallization fermentation with immobilized *Rhizopus oryzae* / T. Yamane, R. Tanaka // *J. Biosci. Bioeng.* - 2013.
129. Shen, X. Lactic acid production from cellulosic waste by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* / X. Shen, L. Xia // *World. J. Microbiol. Biotechnol.* - 2006. - Vol. 22. - 1109–1114 pp.
130. John, R. P. Production of L-(+) lactic acid from cassava starch hydrolyzate by immobilized *Lactobacillus delbrueckii* / R. P. John, K. M. Nampoothiri, A. Pandey // *J. Basic Microbiol.* - 2007a. - Vol. 47. - 25–30 pp.
131. Rangaswamy, V. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor / V. Rangaswamy, S. V. Ramakrishna // *Lett. Appl. Microbiol.* - 2008. - Vol. 46. - 661–666 pp.
132. Amrane A. A novel concept of bioreactor: specialized function two-stage continuous reactor, and its application to lactose conversion into lactic acid / A. Amrane, Y. Prigent // *J. Biotechnol.* - 1996. - Vol. 45. - 195–203 pp.
133. Wee, Y. J. Lactic acid production by *Lactobacillus sp.* RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials / Y. J. Wee, H. W. Ryu // *Bioresour. Technol.* - 2009. - Vol. 100. - 4262–4270 pp.
134. Bustos G. Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates through continuous production of lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus* / G. Bustos, N. de la Torre, A. B. Moldes et al. // *J. Food. Eng.* - 2007. - Vol. 78. - 405–412 pp.

135. Gassem M. A. Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* RR in a continuous fermentor / M. A. Gassem, K. A. Sims, J. F. Frank et al. // Lebensm. Wiss. Technol. - 1997. - Vol. 30. - 273–278 pp.
136. Ohara H. Kinetics of growth and lactic acid production in continuous and batch culture / H. Ohara, K. Hiyama, T. Yoshida // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1992. - Vol. 37. - 544–548 pp.
137. Shibata K. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a newly-isolated lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium* / K. Shibata, D. M. Flores, G. Kobayashi et al. // Enzyme. Microb. Technol. - 2007. - Vol. 41. - 149–155 pp.
138. Bomrungnok, W. Single step lactic acid production from cassava starch by *Lactobacillus plantarum* SW14 in conventional continuous and continuous with high cell density / W. Bomrungnok, K. Sonomoto, S. Pinitglang et al. // APCBEE Procedia - 2012. - Vol. 2. - 97-103 pp.
139. John, R.P. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives / R. P. John, K. M. Nampoothiri, A. Pandey // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2007b. - Vol. 74. - 524–534 pp.
140. Tashiro, Y. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* QU 41/ Y. Tashiro, W. Kaneko, Y. Sun et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2011. - Vol. 89. - 1741–1750 pp.
141. Chang, H. N. Multistage high cell continuous fermentation for high productivity and titer / H. N. Chang, N. J. Kim, J. Kang et al. // Bioprocess. Biosyst. Eng. - 2011. - Vol. 34. - 419–431 pp.
142. John, R.P. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives / R. P. John, K. M. Nampoothiri, A. Pandey // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2007b. - Vol. 74. - 524–534 pp.
143. Ozturk, S. S. Scale-up and optimization of high density cell culture bioreactors. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994
144. Lu Z., Wei M., Yu L. Enhancement of pilot scale production of L-(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using membrane bioreactor / Process. Biochem. – 2012. – Vol. 47. - 410–415.

145. Xu, G.Q. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei* / G. Q. Xu, J. Chu, Y. H. Wang et al. // Process. Biochem. – 2006. – Vol. 41. - 2458–2463 pp.
146. Ramchandran, L. Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis ssp. cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process / L. Ramchandran, P. Sanciolò, T. Vasiljevic et al. // J. Membr. Sci. – 2012. – Vol.403. - 179–187 pp.
147. Jung I., Lovitt R. W. A comparative study of the growth of lactic acid bacteria in a pilot scale membrane bioreactor / J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 85. - 1250–1259 pp.
148. Kulozik, U. High reaction rate continuous bioconversion in a tubular bioreactor with narrow residence time distributions for the production of lactic acid / U. Kulozik, B. Hammelehle, J. Pfeifer et al. // J. Biotechnol. – 1992. – Vol. 22. - 107–116 pp.
149. Kwon, S. High rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor / S. Kwon, I. K. Yoo, W. G. Lee et al. // Biotechnol. Bioeng. – 2001. – Vol. 73. - 225–234 pp.
150. Chang, H. N. High density cell culture by membrane-based cell recycle / H. N. Chang, I. K. Yoo, B. S. Kim // Biotechnol. Adv. - 1994. - Vol. 12. - 467–487 pp.
151. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: «Мир», 1987.
152. Yun J. et al. Fermentative production of DL -lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolysate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus sp.* // 2004. - 1613–1616 pp.
153. Kuo Y. et al. Bioresource technology production of optically pure L -lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D -lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain // Bioresour. Technol. - 2015. - Vol. 198. - 651–657 pp.
154. Gaudreau H. et al. Effect of ultrafiltration of yeast extracts on their ability to promote lactic acid bacteria growth // 1999. - Vol. 897. - 891–897 pp.
155. Егоров Н.С. Промышленная микробиология. М: Рипол Классик, 1989. 688 с.

156. Nancib N. et al. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* // Bioresour. Technol. - 2001. - Vol. 78, № 2. - 149–153 pp.
157. Moon S.K., Wee Y.J., Choi G.W. Utilization of by-products derived from bioethanol production process for cost-effective production of lactic acid // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 2014. - Vol. 41, № 10. - 1525–1531 pp.
158. Ewe J., Liong M. Viability and growth characteristics of *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins // 2010. - Vol. 61, № 2. - 87–107 pp.
159. Petrov K., Popova L., Petrova P. High lactic acid and fructose production via Mn^{2+} -mediated conversion of inulin by *Lactobacillus paracasei* // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2017.
160. Desguin B et al. Enantioselective regulation of lactate racemization by LarR in *Lactobacillus plantarum* // J. Bacteriol. - 2015. - Vol. 197, № 1. - 219–230 pp.
161. Hayek S.A. et al. Enzymatic activity of *Lactobacillus reuteri* grown in a sweet potato based medium with the addition of metal ions // 2013. - 1–10 pp.
162. Cheng X. et al. Improvement of the fermentative activity of lactic acid bacteria starter culture by the addition of Mn^{2+} // 2014. - 1752–1760 pp.
163. Lew L. et al Mn^{2+} and Mg^{2+} synergistically enhanced lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* FTDC 8313 via affecting different stages of the hexose monophosphate pathway // 2013.
164. Coelho L.F. et al. D(-)-Lactic Acid Production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 Using Different Carbon and Nitrogen Sources // 2011. - 1160–1171 pp.
165. Liguori R. et al. Selection of the Strain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and Its Application to Brewers' Spent Grain Conversion into Lactic Acid // Biomed Res. Int. 2015. Vol. 2015.
166. Kwon S. et al. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. // Enzyme Microb. Technol. - 2000. - Vol. 26, № 2–4. - 209–215 pp.

167. Mazumdar S., Bang J., Oh M.K. L-lactate production from seaweed hydrolysate of *Laminaria japonica* using metabolically engineered *Escherichia coli* // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2014. - Vol. 172, № 4. - 1938–1952 pp.
168. Shi Z. et al. Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors // Enzyme Microb. Technol. - 2012. - Vol. 51, № 5. - 263–268 pp.
169. Wang J. et al. Effect of fermentation conditions on L-lactic acid production from soybean straw hydrolysate // J. Microbiol. Biotechnol. - 2014. - Vol. 25, № 1. - 26–32 pp.
170. Li Z. et al. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation with corn steep liquor-supplemented acid-hydrolysate of soybean meal // Biotechnol. J. - 2006. - Vol. 1, № 12. - 1453–1458 pp.
171. Chen H. et al. Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by plackett-burman and steepest ascent experiment // 2015. - Vol. 12186. - № 2010. - 3–8 pp.
172. Гордиенко М.Г. и др. Измерения. Статистическая обработка результатов пассивного и активного экспериментов в биотехнологии // М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015. – 108 с.
173. Piccolomini A.A. et al. Optimization of thermophilic *trans*-isoprenyl diphosphate synthase expression in *Escherichia coli* by response surface methodology // Biotechnol. Appl. Biochem. - 2017. - Vol. 64, № 1. - 70–78 pp.
174. Khosravi A. et al. Bioconversion enhancement of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* using the culture media manipulation and numerical optimization // J. Food Sci. Technol. - 2015. - Vol. 52, № 9. - 5781–5789 pp.
175. Liste-Calleja L., Lecina M., Cairó J.J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms // J. Biosci. Bioeng. - 2014. - Vol. 117, № 4. - 471–477 pp.
176. Mazzucotelli C.A. et al. Optimization of medium components and physicochemical parameters to simultaneously enhance microbial growth and production of lypolitic

- enzymes by *Stenotrophomonas sp.* // *Biotechnol. Appl. Biochem.* - 2016. - Vol. 63, № 3. - 407–418 pp.
177. Zou S.P. et al. Mutagenesis breeding of high echinocandin B producing strain and further titer improvement with culture medium optimization // *Bioprocess Biosyst. Eng.* - 2015. - Vol. 38, № 10. - 1845–1854 pp.
178. Lui, B. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method / B. Lui, M. Yang, B. Qi et al. // *Biochem. Eng. J.* – 2010. – Vol. 52, is.2–3. - 212-219 pp.
179. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. – М.: Медицина, 2003. – 136 с.
180. Сафронов В.В. Интенсивная малоотходная систем биодеструкции загрязнений высококонцентрированных стоков. / Диссертация на соискание степени кандидата технических наук. – М: РХТУ им. Д.И.Менделеева – 2004.
181. Патент РФ № 2394098, 10.07.2010.
182. Патент РФ № 2268924, 27.01.2006.
183. Патент РФ № 2586155, 10.06.2016.
184. Каленов С.В. Культивирование дрожжей и галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса: дис. канд. наук. – М: РХТУ им. Д.И. Менделеева, – 2007.
185. Farr S. B., Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* / *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* – 1991. – Vol. 55, is. 4. - 561-585 pp.
186. Fridovich, I. Oxygen toxicity: a radical explanation / *J. of Exp. Biol.* – 1998. – Vol. 201. - 1203-1209 pp.
187. Duwat, P. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival / P. Duwat, B. Cesselin, S. Sourice // *Internat. J. of Food. Microbiol.* – 2000. – Vol. 55, is. 1–3, –83-86 pp
188. *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to be used in food industry / *Internat. J. of Food Sci. & Technol.* – 2015. – Vol. 50, is. 5

189. Alcántara, C., Zúñiga M., Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23 / *Microbiol.* – 2012. – Vol. 158, is. 5. - 1206 – 1218 pp.
190. De Angelis, M., Gobbetti, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. // *Proteomics.* – 2004. – Vol.4. – 106-122 pp.
191. Papadimitriou, K. et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria // *Microbiol. & Mol. Biol. Rev.* –2016. –Vol. 80 – № 3. – 837–890 pp.
192. Songisepp, E. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers / E. Songisepp, J. Kals, T. Kullisaar et al. // *Nutr. J.* – 2005. – Vol. 4, is. 22. - 1-10 pp.
193. Maldonado, C. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria / C. Maldonado, A. de Moreno de LeBlanc, G. Vinderola et al. // *Clin. & Vac. Immunol.* – 2007. - Vol. 14, No. 5. - 485–492 pp.
194. Lewis, J.C. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae* / J.C. Lewis, R.P. Learmonth, P.V. Attfield et al. // *J. of Ind. Microbiol. & Biotechnol.* – 1997. - Vol. 18. - №1. - 30-36 pp.
195. Соколовский В.Ю., Белозерская Т.А. Действие стрессоров на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa* // *Успехи биологической химии.* - 2000 - Т. 40. - С. 85-152.
196. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev.* - 2002. - Vol. 82. - №1. - 47-95 pp.
197. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. – М.: Медицина, 2003. – 136 с.
198. Сафронов В.В. Интенсивная малоотходная систем биодеструкции загрязнений высококонцентрированных стоков. / Диссертация на соискание степени кандидата технических наук. – М: РХТУ им. Д.И.Менделеева – 2004.
199. Сорокодумов С.Н. Интенсификация процессов спиртообразования и утилизации отходов спиртового производства. / Диссертация на соискание степени кандидата технических наук. – М: РХТУ им. Д.И.Менделеева - 2005.

200. Büyüksönmez, F. Optimization of simultaneous chemical and biological mineralization of perchlorethylene / F. Büyüksönmez, T.F. Hess, R.L. Crawford et al. // *Appl. and Env. Microbiol.* – 1999. - V. 65. - № 6. - 2784-2788 pp.
201. Davies J. M. S., Lowry C. V. and Davies K. J. A. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. – *Archives of biochemistry and biophysics.* – 1995. - Vol. 317, is. 1. - 1-6 pp.
202. Belenky P., Collins J. J. Antioxidant strategies to tolerate antibiotics // *Science.* – 2011. - Vol. 334, issue 18. - 915-916 pp.
203. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г. И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина 2005. 367 с.
204. Hartke, A. Starvation - induced stress resistance in *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL 1403 / A. Hartke, S. Bouche, X. Gansel et al. // *Appl. and Envir. Microbiol.* – 1994. - Vol. 60. - № 9. – 3474 – 3478 pp.
205. Chou L. S., Weimer B. Isolation and characterization of acid – and bile – tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* // *J. Dairy Sci.* - 1999. -Vol. 82. - № 1. - 23 – 31 pp.
206. Kim, W. S. Survival response and rearrangement of plasmid DNA of *Lactococcus lactis* during long-term starvation / W. S. Kim, J. H. Park, J. Ren et al. // *Appl. and Envir. Microbiol.* - 2001. – Vol. 67. - № 10. – 4594-4602 pp.
207. Giraffa, G. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* strains of dairy origin / G. Giraffa, C. Andrighetto, C. Antonello et al. // *Int. J. Food Microbial.* - 2004. - Vol. 91. - № 2. – 129 – 139 pp.
208. Pzoni, L. In vitro adhesion to human cells by viable but nonculturable *Enterococcus faecalis* / L. Pzoni, C. Kotzamandies, M. Yiangou et al. // *Curr. Microbiol.* - 2002. – Vol. 42. - № 2. – 105 -110 pp.
209. Mannu, L. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecornio Sardo cheese / L. Mannu, A. Paba, M. Pes et al. // *J. Appl. Microbiol.* - 2000. – Vol. 89. - № 2. – 191 -197 pp.
210. Woude, M. V. Phase and antigenic variation in bacteria / M. V. Woude, A. J. Baumer // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 17. - № 3. – 581-611 pp.

211. Suh, S. J. Effects of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factor in *Pseudomonas aeruginosa* / S. J. Suh, L. Silo-Suh, D.E. Woods et al. // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. - № 13. – 3890-3897 pp.
212. Cesselin, B. et al. Responses of lactic acid bacteria to oxidative stress // Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. – 2011. – 111–127 pp.
213. Zamocky M., Koller F. Understanding the structure and function of catalases : clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis // Progress in Biophysics & Molecular Biology. – 1999. – Vol. 72. – 19–66 pp.
214. Mongkolsuk S., Helmann J. D. Regulation of inducible peroxide stress responses // Molecular Microbiol. – 2002. – Vol. 45. – №1. – 9–15 pp.
215. Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry // J. Appl. Microbiol. – 2017. – Vol. 122. – №4. – 857-869 pp.
216. Zhang Y., Li Y. Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness // Current Opinion in Biotechnology. – 2013. – Vol. 24. – № 2. – 142–147 pp.
217. Archibald F.S., Fridovich I. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria // J. Bacteriol. – 1981. – Vol. 146. – №3. – 928-936 pp
218. Kono Y., Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* // J. Biol. Chem. – 1983. – Vol. 258. – №10. – 6015-6019 pp.
219. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk / T. Rochat, J. Gratadoux, A. Gruss et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, №8. - 5143-5149 pp.
220. Temperature and respiration affect the growth and stress resistance of *Lactobacillus plantarum* C17 / T. Zotta, A. Guidone, R.G. Ianniello et al. // J. Appl. Microbiol. – 2013. – Vol. 115. - №3. – 848-858 pp.

221. Selection of mutants tolerant of oxidative stress from respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17 / T. Zotta, R.G. Ianniello, A. Guidone et al. // J. Appl. Microbiol. – 2014. – Vol. 116. - №3. – 632-643 pp.
222. Watanabe M., van der Veen S., Nakajima H., Abee T. Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // Microbiology. – 2012. – Vol. 158. - №1. – 293-300 pp.
223. Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus reuteri* / R.G. Ianniello, J. Zheng, T. Zotta et al. // J. Appl. Microbiol. – 2015a. – Vol. 119. - №3. – 763-775 pp.
224. Aeration and supplementation with heme and menaquinone affect survival to stresses and antioxidant capability of *Lactobacillus caseis* strains / R.G. Ianniello, A. Ricciardi, E. Parente et al. // LWT-Food Sci Technol. – 2015b. – Vol. 60. - №2. – 817-824 pp.
225. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 / R.G. Ianniello, T. Zotta, A. Matera et al. // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11. - №11.
226. Li C., Sun J.W., Zhang G.F., Liu L.B. Effect of the absence of the CcpA gene on growth, metabolic production, and stress tolerance in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* // J. Dairy Sci. – 2016. – Vol. 99. – №1. – 104-111 pp.
227. Indigenous and environmental modulation of frequencies of mutation in *Lactobacillus plantarum* / R. Machielsen, I.J. Van Alen-Boerrigter, L.A. Koole et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76. - №5. – 1587-1595 pp.
228. Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 / A.L. Zomer, G. Buist, R. Larsen et al. // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. - №4. – 1366-1381 pp.
229. Lopez de Felipe F., Gaudu P. Multiple control of the acetate pathway in *Lactococcus lactis* under aeration by catabolite repression and metabolites // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 82. – №6. – 1115-1122 pp.

230. Gosalbes M.J., Monedero V., Pérez-Martínez G. Elements involved in catabolite repression and substrate induction of the lactose operon in *Lactobacillus casei* // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – №13. – 3928-3934 pp.
231. Mahr K., Hillen W., Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the CcpA region // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – №1. – 277-283 pp.
232. CcpA affects expression of the groESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum* / C. Castaldo, R.A. Siciliano, L. Muscariello et al. // Microbial Cell Factories. – 2006. – Vol. 5. - №1. – 35 p.
233. Functional analysis of the role of CggR (central glycolytic gene regulator) in *Lactobacillus plantarum* by transcriptome analysis / I.K. Rud, R.S. Naterstad, D. Bongers et al. // Microb. Biotechnol. – 2011. – Vol. 4. - №3. – 345-356 pp.
234. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints / S. Even, N.D. Lindley, P. Loubiere et al. // Mol. Microbiol. - 2002. – Vol. 45. - 1143–1152 pp.
235. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus* CAUH1 and functional identification of a novel acid stress-related transcriptional regulator Ldb0677 / Z. Zhai, F. P Douillard, H. An et al. // Environ. Microbiol. – 2013. – Vol.16., is. 6. - 1524–1537 pp.
236. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures / R. Di Cagno, M. De Angelis, A. Limitone et al. // Appl. Environ. Microbiol. - 2006. – Vol. 72. - 4503–4514 pp.
237. Marceau, A., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C. Analysis of *Lactobacillus sakei* adaptation to its environment by a proteomic approach / Sci. Aliments. - 2002. – Vol. 22. - 97–110 pp.
238. Piper. P. W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol. Rev. – 1993. – Vol. 11. - 339–355 pp.

239. Piper, P.W. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase / P.W. Piper, C. Ortiz-Calderon, C. Holyoak, et al. // Cell Stress Chaperones. – 1997. – Vol. 2. – 12–24 pp.
240. Weitzel, G., Pilatus, U., Rensing, L. The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast // Exp. Cell Res. – 1987. – Vol. 170. – 64–79 pp.
241. Gross, C. A. Function and regulation of the heat shock proteins - 1996. - 1382–1399 pp.
242. Lindquist, S., Craig, E. A. The heat-shock proteins // Annu. Rev. Genet. -1988. – Vol. 22. – 631–677 pp.
243. Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. – 1996. – Vol.19. – 417–428 pp.
244. Bukau, B., Horwich, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines // Cells. – 1998. – Vol. 92. – 351–366 pp.
245. Casadei, M. A. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol / M. A. Casadei, R. Ingram, E. Hitchings, et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2001. – Vol. 63. – 125–134 pp.
246. Van de Guchte M. et al. Stress responses in lactic acid bacteria // Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. - 2002. - Vol. 82. - 187–216 pp.
247. Maleki F. et al. Bacterial heat shock protein activity // Journal of Clinical and Diagnostic Research. - 2016. -Vol. 10. - №3. - 1-3 pp.
248. Sugimoto S., Abdullah-Al-Mahin, Sonomoto K. Molecular Chaperones in Lactic Acid Bacteria: Physiological Consequences and Biochemical Properties // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2008. - Vol. 106. - №4. - 324–336 pp.
249. Desmond, C. Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying / C. Desmond, C. Stanton, G. F. Fitzgerald et al. // Int. Dairy J. – 2001. – Vol. 11. – 801–808 pp.

250. Gouesbet, G., Jan, G., Boyaval, P. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* thermotolerance // Lait. – 2001. – Vol. 81. – 301–309 pp.
251. Broadbent, J. R. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures / J. R. Broadbent, J. C. Oberg, H. Wang, et al. // Syst. Appl. Microbiol. – 1997. – Vol. 20. – 12–19 pp.
252. Laplace, J. M., N. Sauvageot, A. Harke, and Y. Auffray. Characterization of *Lactobacillus collinoides* response to heat, acid and ethanol treatments // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 51. – 659–663 pp.
253. Jordan, K. N., Cogan, T. M. Heat resistance of *Lactobacillus spp.* isolated from Cheddar cheese // Lett. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 29. – 136–140 pp.
254. Gouesbet, G., Jan, G., Boyaval, P. Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thermotolerance // Appl. Environm. Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – 1055–1063 pp.
255. Le Marrec C., Bon E., Lonvaud-Funel A. Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants // International Journal of Food Microbiology. - 2007. - Vol. 115. - №3. - 335–342 pp.
256. Poolman B., Spitzer J. J., Wood J. M. Bacterial osmosensing: Roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions // Biochimica et Biophysica Acta. - 2004. - Vol. 1666. – №1–2. – 88–104 pp.
257. Sleator R. D., Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence // FEMS Microbiology Reviews. – 2001. – Vol. 26. – №26. – 49–71 pp.
258. Obis D. et al. Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters // Journal of Bacteriology. – 1999. – Vol. 181. – №20. – 6238–6246 pp.
259. Xie Y., Weimer B. DNA microarray profiling of *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 gene expression during environmental stresses // Applied and Environmental

- Microbiology. –2004. –Vol. 70. – №11. – 6738–6747 pp.
260. Glaasker E. et al. Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum* // Journal of Bacteriology. – 1998. – Vol. 180. – №21. – 5540–5546 pp.
261. De Angelis, M. Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions / M. De Angelis, M. Calasso, J. Cavallo et al. // Proteomics. – 2016. -Vol.16. - 946-962 pp.
262. Broadbent, J. R., Oberg, J. C., Wang, H., and Wie, L. Attributes of the heat shock response in three species of dairy *Lactobacillus* // Syst. Appl. Microbiol. – 1997. - Vol. 20. - 12–19 pp.
263. Van Asseldonk, M. Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* dnaJ gene // M. Van Asseldonk, A. Simons, H. Visser et al. // J. Bacteriol. – 1993. – Vol. 174. – 1637–1644 pp.
264. Schmidt, G., Hertel, C., Hammes, W. P. Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract system // Appl. Microbiol. – 1999.- Vol. 22. – Vol. 321–328.
265. Eaton, T., Shearman, C., Gasson, M. Cloning and sequence analysis of the dnaK gene region of *Lactococcus lactis subsp. lactis* // J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139. – 3253–3264 pp.
266. Jayaraman, G. C., J. E. Penders, and R. A. Burne. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* hrcA, grpE and dnaK genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification // Mol. Microbiol. - 1997. – Vol. 25. – 329–341 pp.
267. Laport, M. S. Expression of the major heat shock proteins DnaK and GroEL in *Streptococcus pyogenes*: a comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* / M. S. Laport, A. C. de Castro, A. Villardo et al. // Curr. Microbiol. – 2001. – Vol. 42. – 264–268 pp.
268. Zink R. Impact of multiple stress factors on the survival of dairy *lactobacilli* / R. Zink, C. Walker, G. Schmidt et al. // Sci. Aliments. – 2000. – Vol. 20. – 119–126 pp.

269. Kjelleberg, S. How do non-differentiating bacteria adapt to starvation? / S. Kjelleberg, N. Albertson, K. Flardh et al. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1993. – Vol. 63. - 333-341 pp.
270. Duwat, P. Stress response pathways in *Lactococcus lactis* / *Recent Res. Devel. Microbiol.* – 1999. – Vol. 3. - 335-348 pp.
271. Duwat, P. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival / P. Duwat, B. Cesselin, S. Sourice et al. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – Vol. 55, is. 103. - 83-86 pp.
272. Zangh, J., Chongde, W., Xue, F. et al. Stress response in *Lactococcus lactis*. Chapter 10. In *Stress Response in Lactic Acid Bacteria*, eds. Tsakalidou E. and Papadimitriou K. New York, NY: Springer US, 2011. 199-218 pp.
273. Rikhvanov, E.G. Heat shock-induced changes in the respiration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. / E.G. Rikhvanov, N.N. Varakina, T.M. Rusaleva et al. // *Microbiol.* - Vol. 70, № 4. – 2001.- 462-465 pp.
274. Davidson, J.F., Schiestl, R.H. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. / *Molecular and Cellular Biology.* – 2001. - Vol. 21, № 24. - 8483-8489 pp.
275. Arzumanyan, V.G. Antagonistic interaction between stress factors during the growth of microorganisms under conditions simulating the parameters of their natural ecotopes. / V.G. Arzumanyan, N.A. Voronina, O.V. Geidebrekht et al. // *Microbiol.* - Vol. 71, № 2. – 2002. - 133-138 pp.
276. Bayliak, M.M., Semchyshyn, H.M., Lushchak, V.I. Possible accumulation of non-active molecules of catalase and superoxide dismutase in *S. cerevisiae* cells under hydrogen peroxide induced stress / *CEJB.* – Vol.2, is.3. – 2007. - 326-336 pp.
277. Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae* / *J. Biochem.* – 1996. - Vol. 320. - 61-67 pp.
278. Jamieson, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / *Yeast.* - 1998. – Vol.14. - 1511–1527 pp.

279. Washburne, W. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / W. Washburne, E. Braun, G.C. Johnston et al. // *Microbiol. Rev.* – 1993. – Vol. 57. - 383-401 pp.
280. Zotta, T. Temperature and respiration affect the growth and stress resistance of *Lactobacillus plantarum* C17 / T. Zotta, A. Guidone, R.G. Ianniello, et al. // *J. Applied Microbiol.* – 2013. – Vol. 115. - 848-858 pp.
281. Ianniello, R.G. Aeration and supplementation with heme and menaquinone affect survival to stresses and antioxidant capability of *Lactobacillus casei* strains / R.G. Ianniello, A. Parente, E. Tramutola et al. // *LWT-Food Sci. Technol.* - 2015.- Vol. 60. - 817-824 pp.
282. Ianniello, R.G. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 // R.G. Ianniello, T. Zotta, A. Matera et al. // *Plos ONE.* - Vol. 11, № 11. - e0164064.
283. Wu, C., Huang, J., Zhou, R. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria / *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Published online 15 December 2013. doi 10.1007/s00253-013-5435-3.
284. Brioukhanov, A.L., Netrusov, A.I. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review // *Appl. Biochem. & Microbiol.* - 2007. - Vol. 43. - № 6. - 567-582 pp.
285. Corcoran, B.M. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated / B.M. Corcoran, C. Stanton, G. Fitzgerald et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – Vol. 14. – 1382-1399 pp.
286. Desmond, C. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying / C. Desmond, C. Stanton, G.F. Fitzgerald et al. // *Int. Dairy J.* – 2001. – Vol. 11. – 801-808 pp.
287. Pedersen, M. B. The long and winding road from the research laboratory to industrial application of lactic acid bacteria / M. B. Pedersen, S. L. Iversen, K. I. Sorensen et al. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29. – 611-624 pp.

288. Quatravaux, S. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters / S. Quatravaux, F. Remize, E. Bryckaert et al. // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 101. – 903-912 pp.
289. Watanabe, M., van der Veen, S., Abee, T. Impact of respiration on re-sistance of *Lactobacillus plantarum* WCFSi to acid stress / Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78. – 4062-4064 pp.
290. Zotta, T. Inactivation of *ccpA* and aeration affect growth, methabolite production and stress tolerance *Lactobacillus plantarum* WCFS1 / T. Zotta, A. Ricciardi, A. Guidone et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – Vol. 155. - 51-59 pp.
291. Mazzeo, M.F. Effect of inactivation of *ccpA* and aerobic growth in *Lactobacillus plantarum*: a proteomic perspective / M.F. Mazzeo, G. Cacace, A. Peluso et al. // J. Proteom. – 2012. – Vol. 75. – 4050-4061 pp.
292. Guidone, A. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group // A. Guidone, R.G. Ianniello, A. Riccardi et al. // Word J. Microbiol. Biotechnol. – 2013a. – Vol. 29. – 1713-1722 pp.
293. Duwat, P., Ehrlich, S.D. and Gruss, A. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress / Mol. Microbiol. – 1995. – Vol. 17. – 1121-1131 pp.
294. Duwat, P. Stress response pathways in *Lactococcus lactis* / Recent Res. Devel. Microbiol. – 1999. – Vol. 3. – 335-348 pp.
295. Eker, A.P.M., Hessels, J.K.C., Dekker, R.H. Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus*. VI. Action spectrum and kinetics of Photoreactivation / Photochem. and Photobiol. – 1986. – Vol. 44, № 2. – 197-205 pp.
296. Sancar, A., Smith, F. W. and Sancar, G. B. Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase / J. Biol. Chem. – 1984. – Vol. 259. – 6028-6032 pp.
297. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase / Biochem. – 1994. – Vol. 33. – 2-9 pp.
298. Sancar, G.B. Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting / Mutat. Res. – 2000. – Vol. 451. – 25–37 pp.

299. Kanai, S. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family / S. Kanai, R. Kikuno, H. Toh et al. // J. Mol. Evol. – 1997. – Vol. 45. – 535–548 pp.
300. Weber S. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyases / Biochem. Biophys. Acta. – 2004.– Vol. 1707. – 1-23 pp.
301. Nicholson W. Photoreactivation in the genus *Bacillus* / Curr. Microbiol. – 1995. – Vol. 31. – 361-364 pp.
302. Wood R.D. DNA repair in eukaryotes / Ann. Rev. Biochem. – 1996. – Vol. 65. – 135-167 pp.
303. Kim, S.-T., Sancar, A. Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase // Photochem. and Photobiol. – 1993. – Vol. 57, № 5. – 895-904 pp.
304. Essen I.O., Klar T. Light-driven DNA repair by photolyases / Cell. Mol. Life Sci. – 2006. – Vol.63. – 1266-1277 pp.
305. Srittmatter C. F. Flavin-linked oxidative enzymes of *Lactobacillus casei* // J. Biol. Chem. – 1959. – Vol. 234, № 10. - 2794 -2800 pp.
306. Berrocal-Tito G., Sametz-Baron L., Eichenderg K., Horwitz B.A., Herrera-Estrella A. Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. //J. of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274, № 20, iss. of May 14. –14288-14294 pp.
307. Mitani H., Shima A. Induction of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase in cultured fish cells by fluorescent light and oxygen stress // Photochemistry and Photobiology. – 1995. – Vol. 61, № 4. – 373-377 pp.
308. Fukui A., Laskowski W. Modifying factors of the cellular concentration of photolyase molecules in *Saccharomyces cerevisiae* cells – II. Effects of preillumination with light flashes // Photochemistry and Photobiology. – 1984. - Vol. 40, № 2. - 227-230 pp.
309. Кузнецов А.Е. Контролируемый окислительный стресс – новый путь совершенствования процессов биосинтеза и биологической очистки. – В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 5-го

- Международного конгресса (Москва, 16-20 марта 2009г.). – М.: ЗАО «Экспобиохимтехнологии» 2009. - ч. 1. - С. 370 -371.
310. Davies, K.J.A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life // Biochem. Soc. Symp. – 1995. – Vol. 61. - 1-31 pp.
311. Narendranath, N. V., Thomas, K. C., Ingledew, W. M. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of Lactobacilli, nourishes Yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation // Appl. and Environ. Microbiol. – 2000. - Vol. 66, is. 10. - 4187–4192 pp.
312. Liltved, H., Landfald, B. Effects of high intensity light on ultraviolet-irradiated and non-irradiated fish pathogenic bacteria // Water Research. – 2000. - Vol. 34, is. 2. - 481-486 pp.
313. Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay / K. Oguma, H. Katayama, Sh. Ohgaki // Appl. & Environ. Microbiol. – 2002. - Vol. 68, is. 12. -6029–6035 pp.
314. Barbosa, J., Borges, S., Teixeira P. Influence of sublethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice / Food Microbiology. – 2015. – Vol. 52. – P. 77-83.
315. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. - М.: Академия. - 2005. - 608 с.
316. Низовкин В. К. Эбулиостатическое определение сахаров // Журнал прикладной химии. - 1959. - Т. 32, № 11. - С. 2516–2521.
317. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водород // Вопр. мед. Химии. – 1997. – Т. 43, - №2. - С. 87-93.
318. Beers, R.F., Siser, I.W. A Spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. - 1952. - Vol. 195, № 1. - 276-289 pp.

319. Nandakumar, R. Proteome Analysis of Membrane and Cell Wall Associated Proteins from *Staphylococcus aureus* / R. Nandakumar, M. P. Nandakumar, M. R. Marten et al. // Journal of Proteome Research – 2005. – Vol.4. – 250 – 257 pp.
320. Общая биотехнология. Лабораторный практикум: учебное пособие РХТУ / И.В. Шакир, А.А. Красноштанова, Е.В. Парфенова – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2001. – 68 с.
321. Cheng, X. Improvement of the fermentative activity of lactic acid bacteria starter culture by the addition of Mn^{2+} / X. Cheng, Y. Dong, P. Su et al. // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2014. – Vol.174. – 1752–1760 pp.
322. Rossi F. Theoretical insight into the heat shock response (HSR) regulation in *Lactobacillus casei* and *L. rhamnosus* / Rossi F., Zotta T., Iacumin L., Reale A. // Journal of Theoretical Biology – 402. – 2016. – 21–37 pp.