

Научная статья

УДК 579.66

DOI: 10.17586/2310-1164-2023-16-3-40-50

Влияние различных концентраций глюкозы на синтез молочной кислоты бактериями рода *Enterococcus*

А.П. Непомнящий^{1*}, Н.Ю. Шарова^{1,2}, Р.Е. Моисеев^{1,2}, В.Э. Путилов^{1,2}, О.П. Сverdlova¹, И.Н. Зубков¹, А.А. Принцева¹¹ВНИИ пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
Россия, Санкт-Петербург, *nepomnyashiy.95@mail.ru
²Университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

Аннотация. Исследовали влияние концентрации глюкозы в питательной среде на рост бактериальных изолятов *Enterococcus faecium* и *Enterococcus* sp. из пшеничных отрубей, деструктурированных под действием гидролитических ферментов аборигенной микробиоты в течение различного периода времени с целью получения более простого субстрата, и биосинтез молочной кислоты. Культуры были идентифицированы с помощью секвенирования гена 16S рРНК. Культивирование проводилось в шейкере-инкубаторе в течение 50 ч. Кинетика роста бактерий оценивалась путем измерения оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 600 нм, а содержание молочной кислоты определялось фотометрическим методом с использованием хлорида железа (III). В качестве компонентов питательной среды для культивирования использовали глюкозу и дрожжевой экстракт, а также свекловичную мелассу. Показано, что максимальная оптическая плотность, характеризующая накопление биомассы и содержание молочной кислоты для обоих штаммов, достигались при минимальной концентрации глюкозы в питательной среде (50 г/л). Эти наблюдения указывают на низкую устойчивость исследуемых бактерий к повышенным концентрациям глюкозы в среде. Концентрации глюкозы 100 г/л и выше ингибировали рост биомассы и синтез молочной кислоты. Выявленный эффект позволил предположить принадлежность бактериальных изолятов к олигокарбофилам. При культивировании бактериальной культуры *E. sp.* достигнут наибольший выход (11,65 г/л) молочной кислоты в сравнении с *E. faecium*. Показано, что при содержании глюкозы в среде для культивирования 50 г/л степень конверсии субстрата в лактат достигает 23,3%. При культивировании исследуемых бактериальных изолятов на среде, содержащей свекловичную мелассу в качестве источника углерода, выход лактата составил 23 г/л для штамма *E. faecium* и 22 г/л для *E. sp.* (степень конверсии углеводов в МК 46 и 44%, соответственно). Высокое содержание простых углеводов в составе мелассы способствует повышению продуктивности биомассы по биосинтезу молочной кислоты.

Ключевые слова: промышленные биотехнологии; молочная кислота; *Enterococcus faecium*; культивирование; глюкоза; меласса; спектрофотометрия

Финансирование: Исследования проведены по теме FGUS-2022-0003 в рамках государственного задания № 075-01190-22-00 ВНИИ пищевых добавок – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Original article

The influence of different glucose concentrations on the synthesis of lactic acid by *Enterococcus* bacteria

Anatoly P. Nepomnyashchy^{1*}, Natalia Yu. Sharova^{1,2}, Ruslan E. Moiseev^{1,2}, Vladislav E. Putilov^{1,2}, Olga P. Sverdlova¹,
Ilya N. Zubkov¹, Anastasia A. Printseva¹¹All-Russia Research Institute for Food Additives – Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS
St. Petersburg, Russia, *nepomnyashiy.95@mail.ru
²ITMO University, St. Petersburg, Russia

Abstract. In the present work, we investigated the effect of glucose concentration in the nutrient medium on the growth of bacterial isolates *Enterococcus faecium* and *Enterococcus* sp. from wheat bran, degraded by the action of native microbiota for various periods of time, and lactic acid biosynthesis. The cultures were identified by sequencing the 16S rRNA gene. Cultivation was carried out in a shaker incubator for 50 hours. The kinetics of bacterial growth was evaluated by measuring the optical density of the culture fluid at a wavelength of 600 nm; the lactic acid content was determined by photometric method using iron (III) chloride. Glucose and yeast extract, as well as beet molasses, were used as components of the culture medium for cultivation. It is shown that the maximum optical density characterizing the accumulation of biomass and the lactic acid content for both strains were achieved with a minimum concentration of glucose in the nutrient medium (50 g/l). These observations indicate a low resistance of the studied bacteria to elevated concentrations of glucose in the medium. Glucose concentrations of 100 g/l and above inhibited biomass growth and lactic acid synthesis. The revealed effect allowed us to make an assumption about the belonging of bacterial isolates to oligocarbofiles. When culturing a bacterial culture of *E. sp.*, the highest yield (11.65 g/l) of lactic acid was achieved in comparison with *E. faecium*.

It has been shown that when the glucose content in the culture medium is 50 g/l, the conversion rate of the substrate to lactate reaches 23.3%. When culturing the studied bacterial isolates on a medium containing beet molasses as a carbon source, the lactate yield was 23 g/l for the *E. faecium* strain and 22 g/l for *E. sp.* (the degree of carbohydrate conversion to МК is 46% and 44%, respectively). The high content of simple carbohydrates in molasses contributes to an increase in the productivity of biomass for the biosynthesis of lactic acid.

Keywords: industrial biotechnology; lactic acid; *Enterococcus faecium*; fermentation; glucose; molasses; spectrophotometry

Financial Support: The research was conducted on the topic FGUS-2022-0003 within the framework of the state task no. 075-01190-22-00 of the All-Russia Research Institute for Food Additives – Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS

Введение

Одной из важных отраслей промышленной биотехнологии является производство пищевых добавок [1]. К числу особо востребованных относятся такие органические кислоты, как лимонная, молочная, винная, яблочная и т.д. Одной из наиболее применяемых органических кислот в пищевой промышленности является молочная кислота (МК), которая используется в качестве регулятора кислотности, антиоксиданта, подкислителя, консерванта. На сегодняшний день в Российской Федерации МК является полностью импортозависимым продуктом [2].

Существует два основных метода получения молочной кислоты: химический и биосинтетический. Химический синтез основан на реакции ацетальдегида с циановодородом. В результате процесса образуется лактонитрил, который переходит в молочную кислоту посредством гидролиза с участием соляной кислоты [3]. Кроме этого существует способ получения молочной кислоты в ходе реакции гидратации 2-хлорпионовой кислоты – ферментативный метод, основанный на молочнокислом брожении. В ходе гликолиза из одной молекулы гексозы образуется две молекулы пирувата, которые в анаэробных условиях под действием лактатдегидрогеназы превращаются в лактат [4, 5].

Молочная кислота существует в виде двух хиральных изомеров. Химический синтез позволяет получить рацемическую смесь. Микробный биосинтез позволяет получить МК в виде единственного оптического изомера – L или D, в зависимости от продуцента. В сравнении с L-формой D-лактат медленнее усваивается организмом, поэтому в сфере пищевых добавок используется L изомер. Однако для получения полилактида используют оба изомера [6].

В последние годы во всем мире наблюдается значительный рост спроса на пищевые добавки, полученные путем микробиологического синтеза, включая молочную кислоту. Этот рост обусловлен тем, что такие компоненты считаются натуральными, что приводит к повышенному потребительскому интересу.

Исходя из опыта применения «зеленых» стандартов на международном уровне, минимизация негативного воздействия на окружающую среду и эффективное использование ресурсов достигаются путем использования биотехнологических методов для переработки вторичного сырья в качестве источников углерода и азота. Высоким потенциалом в производстве МК обладают такие отходы пищевых производств, как меласса свекловичная, меласса тростниковая, гидролизат семян гороха, кукурузный сироп, кожура цитрусовых [7, 8].

Сахарная свекла в России все еще остается одной из основных сельскохозяйственных культур, уровень производства которых определяет продовольственную безопасность страны. Оттек, полученный при центрифугировании утфеля последней ступени кристаллизации, не разбавленный водой, содержащий в растворе сахарозу, несахара и нерастворившиеся мелкие кристаллы сахарозы, прошедшие через сито центрифуги, называют мелассой. Из азотистых веществ в мелассе содержится около одной трети бетаина, остальное – аминокислоты и амиды. Из аминокислот преобладают глутаминовая кислота и продукт ее превращения – пирролидонкарбоновая кислота. В общей массе азота бетаин и глутаминовая кислота составляют 40–70%. В мелассе присутствуют также микроэлементы: Al, Mg, Fe, Mn, Cu, Sr, Si и др. Для сахарного производства меласса является отходом, но для ряда отраслей пищевой и комбикормовой промышленности она служит ценным сырьем. В обогащенном сусле, приготовленном из мелассы, выращивают хлебопекарные дрожжи.

Для биотехнологического производства важной является проблема импортозамещения, решение которой связано с расширением сырьевой базы. На данный момент хорошо исследованными субстратами для синтеза молочной кислоты являются простые сахара. В связи с этим, для наращивания сырьевой базы для биотехнологического процесса можно рассматривать применение сырья, в состав которого входят простые углеводы.

Направленный биосинтез того или иного вещества во многом определяется выбором продуцента. На первом этапе работы был проведен сравнительный анализ способности штаммов-продуцентов, селекционированных во ВНИИ пищевых добавок (филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН), к биосинтезу молочной кислоты при глубокой ферментации сахаросодержащих питательных сред в условиях шейкера-инкубатора Multitron.

Для биосинтеза молочной кислоты основным источником углерода являются углеводы. Распространенным углеводным субстратом для биосинтеза молочной кислоты являются простые углеводы, которые содержатся в мелассе – отходе свеклосахарного производства.

В последние годы мировое потребление молочной кислоты значительно возросло из-за использования в различных отраслях промышленности, что обуславливает развитие исследований научно-прикладного характера по созданию новых технологий ее производства. Их создание предполагает наряду с поиском и подбором штаммов продуцентов, способных осуществлять интенсивную и наиболее полную конверсию углеводов в молочную кислоту, расширение сырьевой базы с целью замены дорогостоящих источников сахаров более дешевыми [9, 10].

Потребление молочной кислоты для пищевых целей составляет около 85% всего объема потребления. Это обусловлено уникальным сочетанием ее физико-химических, технологических и органолептических свойств: сильное антимикробное действие и низкий порог ощущения кислоты, высокая скорость диффузии и низкая скорость инверсии сахарозы, высокая проникающая способность в клетки и ткани и низкое значение константы диссоциации. Регулируя рН среды, молочная кислота создает благоприятные условия для направленного течения биохимических процессов, положительно влияющих на структуру, консистенцию, вкусовые качества и пищевую ценность продуктов, практически не имеет ограничений по срокам хранения, безопасна и физиологически безвредна в применении [11].

В настоящее время в России по действующей нормативно-технической документации МК используется в производстве безалкогольных напитков, пива, кваса, алкогольной и масложировой продукции, кондитерских изделий, хлеба, хлебобулочных изделий, продуктов переработки плодов, овощей и дрожжей как регулятор кислотности, а также для улучшения вкуса, запаха и структуры продуктов, предотвращения развития болезней, вызываемых бактериями. Как пищевая добавка она может быть также с успехом применена в мясоперерабатывающей, рыбной и молокоперерабатывающей отраслях наряду с другими используемыми пищевыми кислотами. Молочную кислоту получают либо биотехнологическим ферментативным, либо химическим синтезом, но первый способ в последнее время получил значительный интерес из-за экологических проблем и ограниченного сырья. Возросший спрос на пищевую молочную кислоту в связи с расширением сфер ее применения обусловил развитие исследований научно-прикладного характера по созданию новых технологий ее производства. Их создание предполагает наряду с поиском и подбором новых штаммов продуцентов, способных осуществлять интенсивную и наиболее полную конверсию углеводов в молочную кислоту, применение эффективных и отвечающих требованиям безопасности и экологии способов выделения и очистки целевого продукта [12].

Для того чтобы биотехнологическое производство МК было возможным, необходимо дешевое сырье, поскольку производители полимеров и другие промышленные потребители обычно требуют больших количеств молочной кислоты по относительно низкой цене. Сырье для ее производства должно иметь следующие характеристики: дешевое, низкое содержание загрязняющих веществ, быстрый темп производства, высокий выход, незначительное образование побочных продуктов или их отсутствие, способность ферментироваться с незначительной предварительной обработкой или без нее и круглогодичная доступность. Отечественное производство молочной кислоты, предназначенной для использования в пищевой промышленности в качестве пищевой добавки Е 270, базируется на

периодическом сбраживании сахаросодержащего сырья молочнокислыми бактериями *Lactobacillus delbrueckii*, синтезирующими D (-)-, L (+)- и DL-молочные кислоты [10].

Перспективными продуцентами молочной кислоты являются бактерии рода *Enterococcus*, в частности, *Enterococcus faecium* и *Enterococcus* sp. [11], известные своей способностью к ферментации углеводов и гомоферментативному синтезу МК, поэтому исследование их физиологии и метаболической активности может повысить эффективность процесса биосинтетического получения МК [12].

Цель настоящего исследования – изучение роста и метаболической активности штаммов *Enterococcus faecium* и *Enterococcus* sp. при различных концентрациях глюкозы в питательной среде. Поставлена серия экспериментов по изучению зависимости кинетики роста культур и выхода молочной кислоты от концентрации глюкозы в среде для культивирования.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования являются бактериальные изоляты *E. sp.* и *E. faecium*, выделенные из ферментированных пшеничных диетических отрубей от АО «Петербургский мельничный комбинат» (Санкт-Петербург, Россия) по описанной методике [13].

Идентификация изолятов проводилась путем секвенирования фрагмента гена 16S рРНК во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Геномную ДНК выделяли коммерческим набором «Сорб-ГМО-Б» (НПК «Синтол», Россия). Матрицы для секвенирования синтезировали с помощью ПЦР, используя для идентификации по гену 16S рРНК пары универсальных праймеров: 5'GCCGGAGGTCATGCTAGTGGAGTC3' и 5'AGGAGGTGATCCAGCCGCAGATTCC3' [8]; fD1 5'AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG3' и rD1 5'CTTAAGGAGGTGATCCAGCC3' [14].

ПЦР выполняли в течение 30 циклов: денатурация 30 с при 95°C, отжиг 1 мин при 40°C и полимеризация в течение 2 мин при 72°C. Продукты ПЦР (~1540 п. н.) разделяли электрофорезом в агарозном геле и извлекали с помощью набора Nucleotrap (Macherey-Nagel, Германия). Использовали генетический анализатор ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, США). Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью базы данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в базе данных Gene Bank Национального центра биотехнологической информации США. Для выделения ДНК использовали набор реагентов из пищевых продуктов, растительного сырья и кормов «Сорб-ГМО-Б» (НПК «Синтол», Россия). Для проведения некоторых операций по протоколу набора использовали термощейкер Eppendorf ThermoMixer C (Германия), лабораторную центрифугу Eppendorf Centrifuge 5418 (Германия) и вортекс универсальный IKA Lab dancer (Германия). Колонии микроорганизмов идентифицировали методом секвенирования по Сенглеру по гену 16S. Выделение ДНК проводилось на базе ВНИИ пищевых добавок, а постановка ПЦР и секвенирование по Сенглеру – на базе ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Название микроорганизмов определяли с помощью сайта BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Культивирование бактериальных изолятов проводилось в шейкере-инкубаторе Inforce Multitron HT (Швейцария) в конических колбах вместимостью 750 мл с рабочим объемом культуральной жидкости 100 мл в течение 50 ч.

Состав питательной среды для инокулята включает 30 г/л глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 10 г/л K_2HPO_4 . Питательная среда, использованная для культивирования, содержит 50–250 г/л глюкозы и 20 г/л дрожжевого экстракта. В ходе эксперимента культивирование каждого штамма проводилось в пяти различных средах с разными концентрациями глюкозы. Инокулят культивировался в течение 24 ч в шейкере-инкубаторе в конических колбах с рабочим объемом 100 мл при температуре 38°C без перемешивания. По истечении суток 10 мл инокулята вносили в качалочные колбы с питательными средами для основной ферментации. Основная ферментация проводилась в шейкере-инкубаторе без перемешивания при температуре 38°C. Отбор проб производился через 5; 10; 20; 25 и 50 ч после внесения инокулята [15].

Для определения концентрации молочной кислоты в культуральной жидкости использовали метод, основанный на реакции с хлоридом железа (III) с образованием лактата железа (III) [16].

Рост бактериальных клеток при культивировании сопровождается увеличением мутности (оптической плотности при длине волны 600 нм), что позволяет оценить кинетику роста бактерий. Измерения оптической плотности проводились на Eppendorf Biospectrometer basic (Германия).

Результаты и их обсуждение

В данной работе было использовано четыре вида бактерий рода *Enterococcus*, выделенные из пшеничных отрубей, деструктурированных под действием собственной микробиоты, и таксономически идентифицированные с помощью анализа гена 16S рРНК. В результате проведенной работы выделены четыре культуры, рост которых доминировал в различные периоды ферментации пшеничных отрубей: *Enterococcus* sp. (2, 7 сут), *Enterococcus hirae* (7 сут), *Enterococcus mundtii* (5 сут), *Enterococcus faecium* (5 сут).

Enterococcus faecium – молочнокислая грамположительная бактерия, не образующая спор и капсул. Факультативный анаэроб. Входит в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта человека, а также некоторых млекопитающих.

Данный микроорганизм способствует созреванию и развитию аромата и вкуса таких сыров, как чеддер, фета, моцарелла из буйволиного молока, цебрейро, венако и испанико, благодаря своей протеолитической и эстеролитической активности и выработке диацетила в результате метаболизма цитрата [17]. Обладает потенциалом как пробиотик для лечения синдрома раздраженного кишечника. Кроме пробиотических свойств культура *Enterococcus faecium* способна снижать уровень холестерина, что позволяет создать функциональные продукты для предотвращения заболеваний сердечно-сосудистой системы [18].

В определенных условиях этот микроорганизм синтезирует бактериоцин – энтероцин 12a [19]. Бактериоцины – это катионные белки прокариотического происхождения, обладающие антимикробными свойствами [21]. Энтероцин 12a ингибирует рост грамотрицательных патогенов (*Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*) и грамположительного патогена *Listeria monocytogenes*. Таким образом, энтероцин 12a обладает многообещающим потенциалом не только в разработке терапевтических средств, но и применении в качестве пищевого консерванта. Кроме антимикробной способности энтероцин 12a подавляет рост раковых клеток.

Enterococcus hirae – молочнокислая грамположительная неспорообразующая бактерия. Факультативный анаэроб. Способна утилизировать ксилоту [19]. Устойчива к танинам и подавляет рост патогенов тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), включая *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Proteus vulgaris* [19]. При добавлении *Enterococcus hirae* в листья клещевины при выращивании увеличивались выживаемость и вес личинок тутового шелкопряда. Благодаря вышеописанным свойствам эта бактерия обладает потенциалом в качестве пробиотика для выращивания тутовых шелкопрядов.

В медицине и пищевом производстве *Enterococcus hirae* интересна как продуцент бактериоцина, такого как энтероцин, подавляющего рост патогенов (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio* sp.) [20]. Следовательно, она обладает потенциалом в консервации продуктов и разработке альтернативных препаратов, заменяющие антибиотики.

Enterococcus mundtii – молочнокислая грамположительная неспорообразующая бактерия. Факультативный анаэроб. Синтезирует бактериоцин, выдерживающий низкую температуру (5–10°C) и ингибирующий рост *Listeria monocytogenes* [21]. Обладает потенциалом в использовании как биоконтрольного агента на проверку качества продуктов в биоконсервации продуктов.

Enterococcus sp. – молочнокислая грамположительная неспорообразующая бактерия. Факультативный анаэроб. В определенных условиях способна образовывать наночастицы золота (AuNP), ингибирующие рост раковых клеток [22]. Обладает потенциалом применения в качестве апоптотического агента для лечения рака толстой кишки [22].

Однако ввиду низкой продуктивности *Enterococcus faecium* и *Enterococcus mundtii* по молочной кислоте, было принято решение остановиться на изучении двух оставшихся выделенных из пшеничных отрубей и идентифицированных видов рода *Enterococcus*.

В ходе эксперимента были получены данные, представленные на рисунках 1–5.

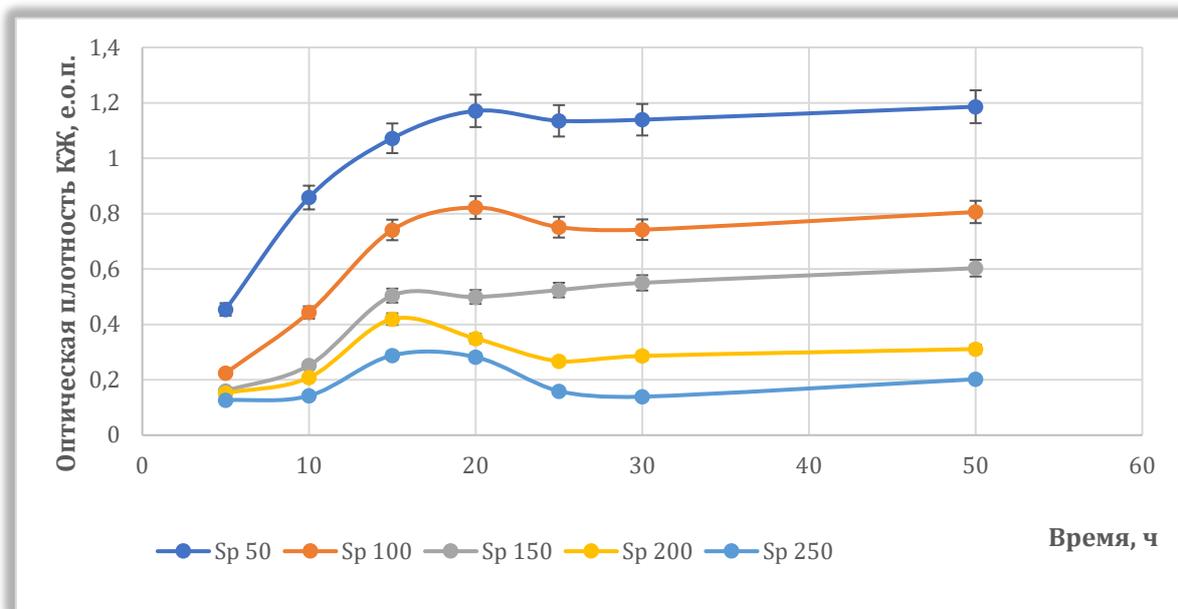


Рисунок 1 – Изменение оптической плотности (длина волны 600 нм) культуральной жидкости при культивировании *E. sp.*

Figure 1. The changes of optical density (wave length is 600 nm) of the culture liquid while cultivating *E. sp.*

На рисунке 1 изображена кинетика роста бактериальной биомассы. Наблюдается обратная зависимость выхода биомассы от концентрации глюкозы: с увеличением содержания субстрата уменьшается скорость роста *E. sp.* Исходя из представленных данных, можем наблюдать негативное влияние высокой концентрации глюкозы в качестве источника углерода на рост биомассы. В случае снижения концентрации источника углерода рост биомассы повышается.

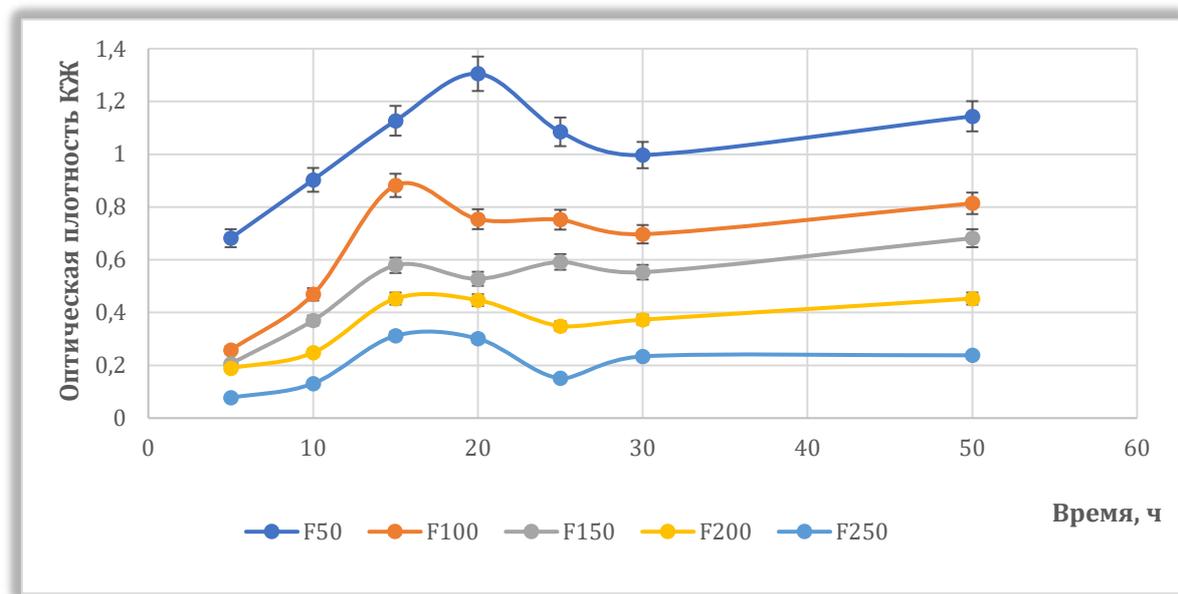


Рисунок 2. Изменение оптической плотности (длина волны 600 нм) культуральной жидкости при культивировании *E. faecium*

Figure 2. The changes of optical density (wave length is 600 nm) of the culture liquid while cultivating *E. faecium*

На графиках, представленных на рисунке 2, наблюдается аналогичная тенденция зависимости роста биомассы от концентрации источника углерода в среде.

На рисунках 3 и 4 изображена кинетика синтеза МК в зависимости от концентрации источника углерода. Наибольшая степень биоконверсии наблюдалась в случае наименьшей концентрации из представленных на графике (50 г/л). Бактерии *E. sp.* показали наибольший выход (11,65 г/л) целевого продукта в сравнении с *E. faecium*.

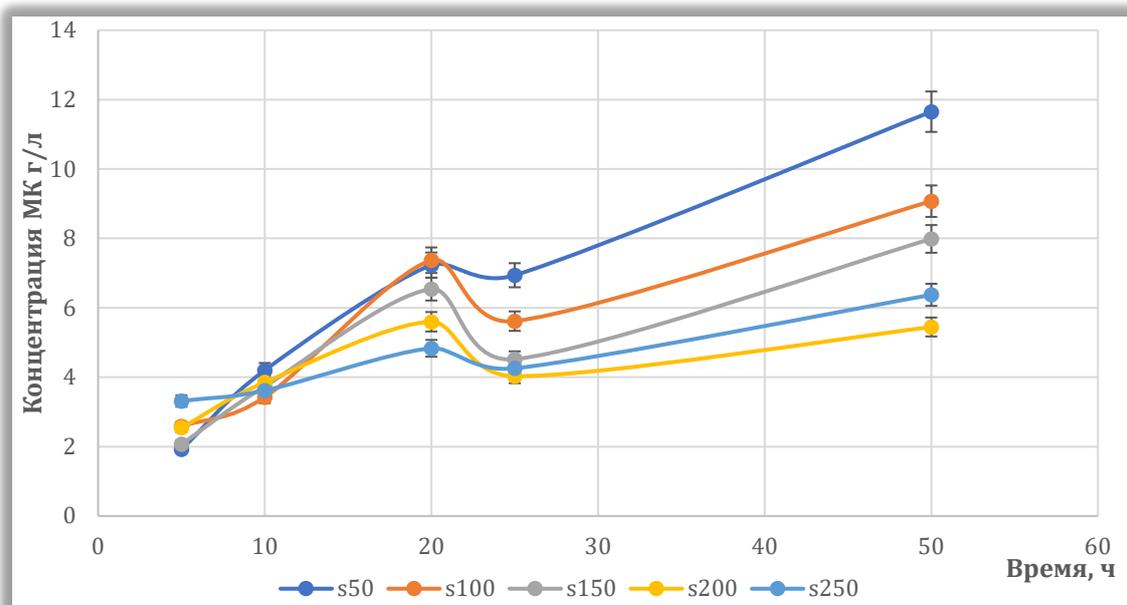


Рисунок 3. Изменение содержания молочной кислоты (МК) в культуральной жидкости при культивировании *E. sp.*

Figure 3. The changes of lactic acid content in culture liquid while cultivating *E. sp.*

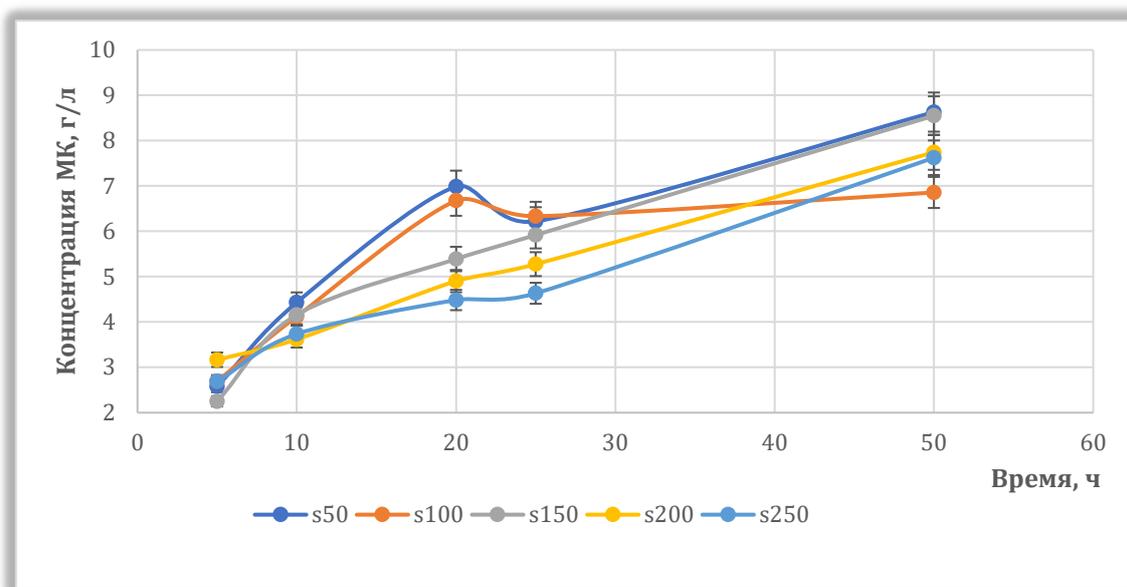


Рисунок 4. Изменение содержания молочной кислоты (МК) в культуральной жидкости при культивировании *E. faecium*

Figure 4. The changes of lactic acid content in culture liquid the culture liquid while cultivating *E. faecium*

На рисунках 1 и 2 видно, что для обоих штаммов максимальная оптическая плотность при длине волны 600 нм наблюдается при концентрации глюкозы 50 г/л. Низкая скорость роста *E. faecium* и *E. sp.*, а также невысокий выход МК при концентрации субстрата 100 г/л и более могут быть связаны с высоким осмотическим давлением в среде для культивирования.

При культивировании *E. sp.* и *E. faecium* на среде, содержащей свекловичную мелассу в качестве источника углерода, выход лактата составил 23 г/л для штамма *E. faecium* и 22 г/л для *E. sp.* (степень конверсии углеводов в МК 46 и 44%, соответственно). Высокое содержание простых углеводов (18,9% глюкозы и 21,2% фруктозы) и сахарозы (7,8%) в составе мелассы способствует высокой продукции молочной кислоты.

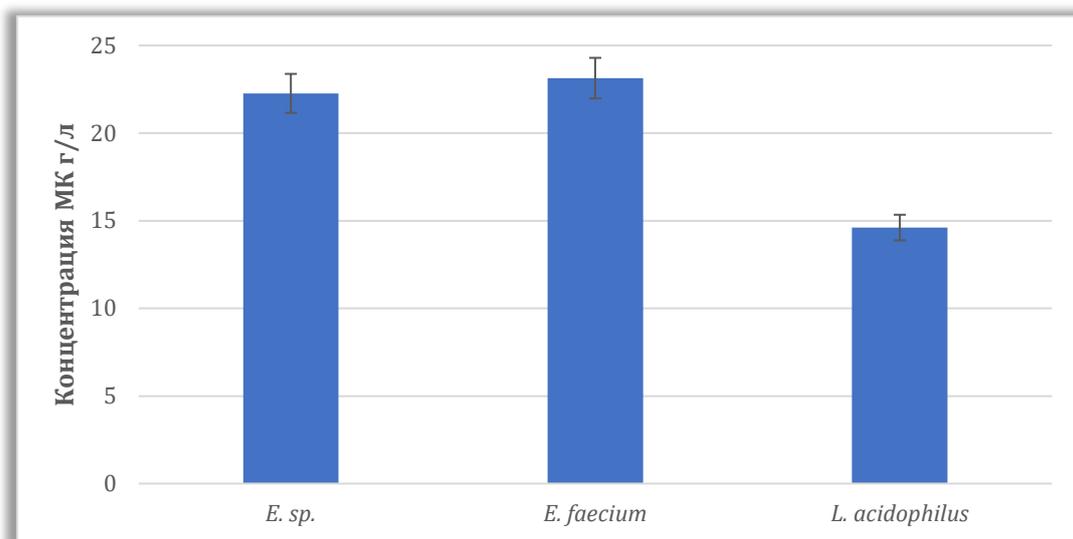


Рисунок 5. Сравнение содержания МК в культуральной жидкости, полученной при культивировании молочнокислых бактерий на мелассной среде

Figure 5. Comparison of lactic acid content in culture liquid obtained by cultivating lactic acid bacteria on molasses medium

На рисунке 5 представлена сравнительная характеристика продуктивности двух культур рода *Enterococcus* и другого известного продуцента молочной кислоты *Lactobacillus acidophilus*. В случае культивирования этих культур в одинаковых условиях с использованием свекловичной мелассы в качестве источника углерода наибольшую продуктивность показал штамм *E. faecium* (22 г/л). Однако штамм *Lactobacillus acidophilus* AT-1, исследованный нами ранее, показал наименьшую продуктивность в сравнении с бактериями рода *Enterococcus*. В данном эксперименте использовали также дрожжевой экстракт в качестве источника азота.

Содержание простых углеводов в свекловичной мелассе не превышает половины от массы сухих веществ. Остальная часть мелассы состоит преимущественно из ди- и олигосахаридов [23], которые не расщепляются многими продуцентами молочной кислоты [24]. Однако известно, что продуцирующие молочную кислоту штаммы *Enterococcus* способны синтезировать амилолитические ферменты [25]. Высокая степень конверсии сахаров мелассы в молочную кислоту (46%) свидетельствует о продукции гликозилгидролаз культурами *E. sp.* и *E. faecium*. Способность расщеплять компоненты свекловичной мелассы позволяет исследуемым изолятам быстро накапливать биомассу и окислять простые углеводы до лактата.

Заключение

Оптическая плотность культуральной жидкости при длине волны 600 нм достигла максимального значения при минимальной исходной концентрации глюкозы в среде (50 г/л) для обоих штаммов – *E. sp.* и *E. faecium*. Это указывает на их предпочтение низким концентрациям глюкозы, что может свидетельствовать об их принадлежности к олигокарбофилам, то есть растущим в условиях лимитирования по углеводному источнику и малоустойчивым к высоким концентрациям глюкозы в среде.

Наибольший выход МК (23,3% для *E. sp.* и 17,3% для *E. faecium*) наблюдался при сравнительно небольшой концентрации мелассы в питательной среде, 50 г/л.

Высокие концентрации глюкозы ингибируют рост биомассы и биохимические реакции, участвующие в биосинтезе МК. Возможной причиной этого явления может быть осмотический стресс и, как следствие, замедление метаболизма бактерий.

Таким образом, бактериальные изоляты из пшеничных отрубей *E. sp.* и *E. faecium* обладают способностью к биосинтезу молочной кислоты на обедненных по источнику углерода средах, в частности глюкозосодержащих. Замена глюкозы на ее сочетание с сахарозой и фруктозой в составе мелассы позволяет повысить продуктивность исследуемых энтерококков по молочной кислоте. Полученные данные создают перспективу масштабного использования меласс – вторичного сырья производства по переработке сахарной свеклы, для получения МК, которая является востребованным в различных

отраслях ингредиентом и многофункциональной пищевой добавкой. Изучаемые культуры энтерококков составляют альтернативу используемым в промышленности культурам рода *Lactobacillus* и интересны для исследования их адаптационных свойств при культивировании на сложных по составу средах для разработки новых эффективных технологий молочной кислоты.

Литература

1. Шодиев Д.А., Нажмитдинова Г.К. Пищевые добавки и их значение // *Universum: технические науки*. 2021. № 10. DOI: 10.32743/UniTech.2021.91.10.12344
2. Евелева В.В., Корищанова Н.А. Современное состояние производства молочной кислоты и комплексных пищевых добавок на основе лактатсодержащих ингредиентов // *Пищевые ингредиенты России 2019: сб. тр. М.: ФНЦ Пищевых систем им. В.М. Горбатова, 2019. С. 27–33.*
3. Starr J.N., Westhoff G. Lactic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2014, pp. 1–8. DOI: 10.1002/14356007.a15_097.pub3
4. Abe T., Horiuchi K., Kikuchi H., Aritsuka T., Takata Y., et al. Structural confirmation of oligosaccharides newly isolated from sugar beet molasses. *Chemistry Central Journal*. 2012, V. 6, no. 1, article 89. DOI: 10.1186/1752-153X-6-89
5. Суханова А.А., Ермилецкая Н.Л., Бояндин А.Н., Сырцов С.Н., Середва А.А., Прокончук Ю.А., Бромм В.В. Исследование характеристик роста штаммов-продуцентов молочной кислоты с использованием глюкозного сиропа в качестве источника углерода // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. № 2. С. 245–254. DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254>
6. Ricci A., Diaz A.B., Caro I., Bernini V., Galaverna G., Lazzi C., Blandino A. Orange peels: from by-product to resource through lactic acid fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 2019, V. 99, no. 15, pp. 6761–6767. DOI: 10.1002/jsfa.9958
7. Michalczyk A.K., Garbaczewska S., Morytz B., Bialek A., Zakrzewski J. Influence of nitrogen sources on D-lactic acid biosynthesis by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM 442 strain. *Fermentation*. 2021, V. 7, no. 2, p. 78. DOI: 10.3390/fermentation7020078
8. Wee Y.-J., Kim J.-N., Ryu H.-W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, V. 44, no. 2.
9. Bogaert J.-C., Coszach P., Mariage P.-A. *Method for producing lactic acid by the fermentation of a self-sufficient medium containing green cane juice*. Pat. 2008095786 WO. 2008.
10. Ramzi A., Aladdin A., Othman Z., Malek R., et al. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015, V. 7, no. 10, pp. 729–735.
11. Вуткарева И., Балан Г., Болога М. Получение L (+)-молочной кислоты при электроактивировании сыворотки // *Электронная обработка материалов*. 2023. Т. 59. № 3. С. 55–60. <https://doi.org/10.52577/eom.2023.59.3.55>
12. Shibata K., Flores D.M., Kobayashi G., Sonomoto K. Direct l-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amyolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, V. 41, no. 1, pp. 149–155. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.12.020
13. Roberts R.M., El-Khawaga A.M., Sweeney K.M., et al. The question of Friedel-Crafts transformylations. Acid-catalyzed reactions of aromatic aldehydes with arenes. *J. Org. Chem.* 1987, V. 52, pp. 1591–1599.
14. Мишина И.И. Биохимия брожения молочного сахара // *Наука молодых: сб. тр. М.: Каргуш, 2021. С. 230–237.*
15. Yun J.S., Wee Y.J., Ryu H.W. Production of optically pure L (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, V. 33, no. 4, pp. 416–423.
16. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Синеокий С.П. Спектрофотометрическое определение молочной кислоты // *Журнал аналитической химии*. 2016. Т. 71. № 8. С. 787–790. DOI: 10.7868/S004445021608003X
17. Guo L., Li T., Tang Y., Yang L., Huo G. Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microb Biotechnol.* 2016, V. 9, no. 6, pp. 737–745. DOI: 10.1111/1751-7915.12306
18. Sharma P., Kaur S., Chadha B., Kaur R., Kaur M., Kaur S. Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*. *BMC Microbiology*. 2021, V. 21, no. 1, article 39. DOI: 10.1186/s12866-021-02086-5
19. Unban K., Klongklaew A., Kodchasee P., et al. Enterococci as dominant xylose utilizing lactic acid bacteria in Eri silkworm midgut and the potential use of *Enterococcus hirae* as probiotic for Eri culture. *Insects*. 2022, V. 13, no. 2, article 136. DOI: 10.3390/insects13020136
20. Gupta A., Tiwari S.K., Natrebov V., Chikindas M.L. Biochemical properties and mechanism of action of enterocin LD3 purified from *Enterococcus hirae* LD3. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2016, V. 8, no. 3, pp. 161–169. DOI: 10.1007/s12602-016-9217-y
21. Pingitore E.V., Todorov S.D., Sesma F., Franco B.D. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiology*. 2012, V. 32, no. 1, pp. 38–47. DOI: 10.1016/j.fm.2012.04.005

22. Vairavel M., Devaraj E., Shanmugam R. An eco-friendly synthesis of *Enterococcus* sp.-mediated gold nanoparticle induces cytotoxicity in human colorectal cancer cells. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020, V. 27, no. 8, pp. 8166–8175. DOI: 10.1007/s11356-019-07511-x
23. Gänzle M.G., Follador R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. *Frontiers in Microbiology*. 2012, V. 3, article 340. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00340
24. Unban K., Kanpiengjai A., Takata G., Uechi K., Lee W.-Ch., Khanongnuch Ch. Amylolytic enzymes acquired from L-lactic acid producing *Enterococcus faecium* K-1 and improvement of direct lactic acid production from cassava starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017, V. 183, pp. 155–170. DOI: 10.1007/s12010-017-2436-1
25. Yerlikaya O., Akbulut N. Potential use of probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains in Izmir Tulum cheese as adjunct culture. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, V. 56, no. 4, pp. 2175–2185. DOI: 10.1007/s13197-019-03699-5

References

1. Shodiev D.A., Najmitdinova G.K. Food additives and their significance. *Universum: Technical Sciences*. 2021, no. 10, pp. 30–32. DOI: 10.32743/UniTech.2021.91.10.12344. (In Russian)
2. Eveleva V.V., Korshunova N.A. Current state of production of lactic acid and complex food supplement based on lactic acid and its derivatives. *Food Ingredients of Russia 2019*. Collection of works. Moscow, Federal Research Center for Food Systems n.a. V.M. Gorbstov Publ. 2019, pp. 27–33. (In Russian)
3. Starr J.N., Westhoff G. Lactic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2014, pp. 1–8. DOI: 10.1002/14356007.a15_097.pub3
4. Abe T., Horiuchi K., Kikuchi H., Aritsuka T., Takata Y., et al. Structural confirmation of oligosaccharides newly isolated from sugar beet molasses. *Chemistry Central Journal*. 2012, V. 6, no. 1, article 89. DOI: 10.1186/1752-153X-6-89
5. Sukhanova A.A., Ertiletskaya N.L., Boyandin A.N., Syrtsov S.N., Sereda A.A., Prokopchuk Yu.A., Brott V.V. Growth characteristics of lactic acid-producing strains using glucose syrup as a carbon source. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023, V. 13, no. 2, pp. 245–254. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254>. (In Russian)
6. Ricci A., Diaz A.B., Caro I., Bernini V., Galaverna G., Lazzi C., Blandino A. Orange peels: from by-product to resource through lactic acid fermentation. *J. Sci. Food Agric*. 2019, V. 99, no. 15, pp. 6761–6767. DOI: 10.1002/jsfa.9958
7. Michalczyk A.K., Garbaczewska S., Morytz B., Bialek A., Zakrzewski J. Influence of nitrogen sources on D-lactic acid biosynthesis by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM 442 strain. *Fermentation*. 2021, V. 7, no. 2, p. 78. DOI: 10.3390/fermentation7020078
8. Wee Y.-J., Kim J.-N., Ryu H.-W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, V. 44, no. 2.
9. Bogaert J.-C., Coszach P., Mariage P.-A. *Method for producing lactic acid by the fermentation of a self-sufficient medium containing green cane juice*. Pat. 2008095786 WO. 2008.
10. Ramzi A., Aladdin A., Othman Z., Malek R., et al. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015, V. 7, no. 10, pp. 729–735.
11. Vutkareva I., Balan G., Bologna M. Preparation of L (+)-lactic acid by electroactivation of whey. *Electronic Processing of Materials*. 2023, V. 59, no. 3, pp. 55–60. <https://doi.org/10.52577/eom.2023.59.3.55>. (In Russian)
12. Shibata K., Flores D.M., Kobayashi G., Sonomoto K. Direct l-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, V. 41, no. 1, pp. 149–155. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.12.020
13. Roberts R.M., El-Khawaga A.M., Sweeney K.M., et al. The question of Friedel-Crafts transformylations. Acid-catalyzed reactions of aromatic aldehydes with arenes. *J. Org. Chem*. 1987, V. 52, pp. 1591–1599.
14. Mishina I.I. Biochemistry of milk sugar fermentation. *Science of the Young*. Collection of works. Moscow, Kartush Publ. 2021, pp. 230–237. (In Russian)
15. Yun J.S., Wee Y.J., Ryu H.W. Production of optically pure L (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, V. 33, no. 4, pp. 416–423.
16. Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sineokii S.P. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*. 2016, V. 71, no. 8, pp. 787–790. DOI: 10.7868/S004445021608003X. (In Russian)
17. Guo L., Li T., Tang Y., Yang L., Huo G. Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microb Biotechnol*. 2016, V. 9, no. 6, pp. 737–745. DOI: 10.1111/1751-7915.12306
18. Sharma P., Kaur S., Chadha B., Kaur R., Kaur M., Kaur S. Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*. *BMC Microbiology*. 2021, V. 21, no. 1, article 39. DOI: 10.1186/s12866-021-02086-5
19. Unban K., Klongklaew A., Kodchasee P., et al. Enterococci as dominant xylose utilizing lactic acid bacteria in *Eri* silkworm midgut and the potential use of *Enterococcus hirae* as probiotic for *Eri* culture. *Insects*. 2022, V. 13, no. 2, article 136. DOI: 10.3390/insects13020136

20. Gupta A., Tiwari S.K., Natrebov V., Chikindas M.L. Biochemical properties and mechanism of action of enterocin LD3 purified from *Enterococcus hirae* LD3. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2016, V. 8, no. 3, pp. 161–169. DOI: 10.1007/s12602-016-9217-y
21. Pingitore E.V., Todorov S.D., Sesma F., Franco B.D. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiology*. 2012, V. 32, no. 1, pp. 38–47. DOI: 10.1016/j.fm.2012.04.005
22. Vairavel M., Devaraj E., Shanmugam R. An eco-friendly synthesis of *Enterococcus* sp.-mediated gold nanoparticle induces cytotoxicity in human colorectal cancer cells. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020, V. 27, no. 8, pp. 8166–8175. DOI: 10.1007/s11356-019-07511-x
23. Gänzle M.G., Follador R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. *Frontiers in Microbiology*. 2012, V. 3, article 340. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00340
24. Unban K., Kanpiengjai A., Takata G., Uechi K., Lee W.-Ch., Khanongnuch Ch. Amylolytic enzymes acquired from L-lactic acid producing *Enterococcus faecium* K-1 and improvement of direct lactic acid production from cassava starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017, V. 183, pp. 155–170. DOI: 10.1007/s12010-017-2436-1
25. Yerlikaya O., Akbulut N. Potential use of probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains in Izmir Tulum cheese as adjunct culture. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, V. 56, no. 4, pp. 2175–2185. DOI: 10.1007/s13197-019-03699-5

Информация об авторах

Анатолий Павлович Непомнящий – аспирант, мл. науч. сотрудник
Наталья Юрьевна Шарова – д-р техн. наук, профессор РАН, зам. директора по научной работе
Руслан Евгеньевич Моисеев – лаборант, студент
Владислав Эдуардович Путилов – лаборант, студент
Ольга Петровна Свердлова – аспирант, мл. науч. сотрудник
Илья Николаевич Зубков – аспирант, инженер
Анастасия Андреевна Принцева – канд. техн. наук, зав. лабораторией

Information about the authors

Anatoly P. Nepomnyashchy, Postgraduate Student, Junior Researcher
Natalia Yu. Sharova, Dr. Sci. (Eng.), Professor of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research
Ruslan E. Moiseev – laboratory assistant, student
Vladislav E. Putilov – laboratory assistant, student
Olga P. Sverdlova – Postgraduate Student, Junior Researcher
Ilya N. Zubkov – Postgraduate Student, Engineer
Anastasia A. Printseva – Ph.D. (Eng.), Head of Laboratory

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests

Статья поступила в редакцию 18.08.2023
Одобрена после рецензирования 18.09.2023
Принята к публикации 20.09.2023

The article was submitted 18.08.2023
Approved after reviewing 18.09.2023
Accepted for publication 20.09.2023