

Культивирование *Leuconostoc mesenteroides* на гидролизате биомассы кукурузы

Инназар А. Хусаинов¹ Fortes16@yandex.ru
Альберт В. Канарский¹ alb@mail.ru

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. К.Маркса, 68, г. Казань, Республика Татарстан, 420015, Россия

Реферат. Бактерии *Leuconostoc mesenteroides* – известный промышленный продуцент внеклеточного бактериального полисахарида декстрана. В качестве основного сырья для промышленного культивирования этих микроорганизмов применяется меласса, сахароза которой является источником углерода и энергии для бактерий, а также предшественником биосинтеза декстрана. Известно, что бактерии рода *Leuconostoc* являются гетероферментативными микроорганизмами и способны утилизировать различные углеводы. Целью данного исследования являлось изучение влияния состава среды на основе гидролизата кукурузы и условий культивирования на выход биомассы бактерий и концентрацию внеклеточного полисахарида в культуральной жидкости. Гидролизат представляет собой продукт хемо-ферментативной обработки растительной лигноцеллюлозной биомассы кукурузы и содержит такие моносахара как глюкоза, арабиноза и ксилоза. Параметрами состава среды являлись концентрация углеводов гидролизата в виде редуцирующих веществ (РВ), концентрация азота (белкового и небелкового), сахарозы и наличие минеральных веществ. Параметры процесса культивирования – pH и температура. Согласно экспериментальным данным, максимальные выходы биомассы бактерий от РВ (9,3 и 8,5%) достигались на комбинированных средах с содержанием сахарозы 0,2% и соли натрия (фосфата натрия), соответственно. Наибольшие удельные скорости роста микроорганизмов (0,0840 и 0,0746) получены на комбинированной среде с содержанием 0,15 и 0,3% неорганического азота соответственно. Наибольшие концентрации внеклеточных полисахаридов 0,840 и 0,583% образуется при наличии в питательной среде солей магния и марганца. Оптимальный уровень pH для эффективной утилизации РВ питательной среды выхода бактериальной биомассы составляет около 7, а температура в диапазоне 30–35 °C.

Ключевые слова: гидролизат лигноцеллюлозной биомассы, бактерии, внеклеточные полисахариды, питательная среда, культивирование, бактериальная биомасса

Growth studies of *Leuconostoc mesenteroides* on corn biomass based substrates

Innazar A. Khusainov¹ Fortes16@yandex.ru
Albert V. Kanarskiy¹ alb@mail.ru

¹ Kazan National Research Technological University, K.Marks str, 68, Kazan, 420015, Russia

Summary. *Leuconostoc mesenteroides* is a well-known industrial producer of extracellular bacterial polysaccharide dextran. The main raw material for industrial cultivation of these microorganisms is molasses. Sucrose of molasses is the main source of carbon and energy for bacteria, as well as a precursor of dextran biosynthesis. It is known that the bacteria of the genus *Leuconostoc* are heterofermentative microorganisms and are capable to utilize various carbohydrates. The purpose of this study was to evaluate the effect of the corn biomass based medium on the yield of bacterial biomass and the concentration of the extracellular polysaccharide. The hydrolyzate is a product of chemo-enzymatic treatment of plant lignocellulosic corn biomass and contains such monosaccharides as glucose, arabinose and xylose. The parameters of the composition of the medium were the concentration of hydrolyzate carbohydrates in the form of reducing substances (RS), the concentration of nitrogen (protein and non-protein), sucrose and the presence of minerals. The parameters of the cultivation process are pH and temperature. According to experimental data, the maximum yield of bacterial biomass (9.3 and 8.5%) were achieved on combined media with a sucrose content of 0.2% and a sodium salt (sodium phosphate), respectively. The highest specific growth rates of microorganisms (0.0840 and 0.0746) are demonstrated on a combined medium with a content of 0.15 and 0.3% inorganic nitrogen, respectively. The highest concentrations of extracellular polysaccharides (0.840 and 0.583%) are formed when magnesium and manganese salts are present in the nutrient medium. The optimal pH level for effective growth is about 7, and the temperature in the range of 30–35 °C.

Keywords: hydrolyzate of lignocellulosic biomass, bacteria, extracellular polysaccharides, nutrient medium, cultivation, bacterial biomass

Введение

Бактерии рода *Leuconostoc* – широко распространенные в природе эпифитные бактерии. Встречаются на злаковых культурах [1], фруктах и овощах [2], принимают активное участие в ферментативных процессах: квашения [3], переработки молока [4–6], хлебопечения [7]. Бактерии *Leuconostoc* обладают многими характеристиками пробиотика и в будущем могут рассматриваться как потенциальный кандидат [8].

Бактерии рода *Leuconostoc* представляют собой гетероферментативные молочнокислые бактерии, факультативные анаэробы, проявляют мезофильные свойства, растут при 10 °C [9].

Leuconostoc обладает высокой вариабельностью в утилизации углеводов [10]. При культивировании *Leuconostoc mesenteroides* на среде с глюкозой в качестве основного углевода в режиме микроаэрации удельная скорость роста μ равна 0,58 ч⁻¹ с выходом биомассы с 1 моль АТФ 16,5 г. Аналогичные показатели

Для цитирования

Хусаинов И.А., Канарский А.В. Культивирование *Leuconostoc mesenteroides* на гидролизате биомассы кукурузы // Вестник ВГУИТ. 2018. Т. 80. № 3. С. 205–211. doi:10.20914/2310-1202-2018-3-205-211

For citation

Khusainov I.A., Kanarskiy A.V. Growth studies of *Leuconostoc mesenteroides* on corn biomass based substrates. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2018. vol. 80. no. 3. pp. 205–211. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2018-3-205-211

получаются при культивировании на фруктозе. При культивировании на среде с сахарозой μ достигал существенно большего значения ($0,98 \text{ ч}^{-1}$) при практически идентичном выходе биомассы в аэрируемой среде – $16,9$. Это объясняется тем, что 62% глюкозных остатков молекул сахарозы расходуется на образование декстрана в количестве $10,9 \text{ г/л}$.

Оптимальные физические параметры культивирования: оптимум pH для роста клеток находится в диапазоне $6,6\text{--}6,9$. Максимальный выход биомассы клеток наблюдается при pH $6,7$ ($7,76 \text{ г/л}$). Максимальный выход декстрана при $5,0$ ($8,51 \text{ г/л}$) при времени ферментации 10 ч . Максимальная ферментативная активность при pH $5,5$ (85 Ед/л). Рост клеток примерно одинаков в диапазоне температур $20\text{--}30^\circ\text{C}$, однако при 35°C выход существенно выше ($7,85 \text{ г/л}$ вместо $5,7$) и ферментация проходит на 4 ч раньше, чем при 20°C (7 ч). Аналогичная закономерность наблюдается с выходом декстрана ($7,94 \text{ г/л}$ вместо $6,91$ при 20°C) и фруктозы, однако максимальная активность фермента декстрансахаразы наблюдается при 20°C . [11].

Основным источником углерода для промышленного культивирования бактерий *Leuconostoc* является сахароза мелассы. Как известно, *Leuconostoc mesenteroides* является гетероферментативными микроорганизмами и могут развиваться на различном субстрате. В литературе недостаточно сведений по культивированию этих микроорганизмов и биосинтезу внеклеточного полисахарида на основе других источников углерода. Большой практический и научный интерес представляет биосинтез внеклеточных бактериальных полисахаридов из альтернативного сырья. Одним из таких видов сырья является растительная лигноцеллюлозная биомасса, технология переработки которой интенсивно развивается в последние годы.

Цель работы – установление закономерностей культивирования бактерий *Leuconostoc mesenteroides* на гидролизате лигноцеллюлозной биомассы кукурузы с получением биомассы бактерий и внеклеточного полисахарида. В соответствие с целью сформулированы следующие задачи:

- Оптимизировать состав питательной среды на основе гидролизата;
- Исследовать режимы культивирования микроорганизмов – уровень pH, температуры

Исследуемые параметры процесса культивирования: выход биомассы бактерий, удельная скорость роста и концентрация внеклеточного полисахарида в культуральной жидкости.

Материалы и методы

Объект исследования – штамм *Leuconostoc mesenteroides* B9280 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ, г. Москва)

Культивирование *Leuconostoc mesenteroides* проводили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл . В качестве основного источника углерода использовали гидролизат лигноцеллюлозной биомассы. Культуру бактерий в объеме приготовленной питательной среды вносили в асептических условиях с помощью микробиологической петли со скошенной поверхности твердой агаризованной среды.

Оптимизацию питательной среды проводили варьированием концентрацией редуцирующих веществ (РВ) гидролизата, сахарозы, белкового и небелкового азота, а также минеральных веществ относительно базового состава среды MRS, рекомендуемого ВКПИМ (азот $0,3\%$, РВ в виде глюкозы 2% или сахарозы 2% , соли натрия, калия, магния, марганца).

Исследование проводилось на следующих составах питательных сред:

Среда 1: Гидролизат с различной концентрацией РВ ($0,5, 1, 2, 3, 4\%$)

Среда 2: Гидролизат (2%), белковый концентрат (концентрация азота в среде $0,15, 0,3, 0,6\%$);

Среда 3: Гидролизат (2%), белковый концентрат, небелковый азот (концентрация азота в среде $0,15, 0,3, 0,6\%$);

Среда 4: Гидролизат (2%), источники азота ($0,3\%$), раствор сахарозы (концентрация сахарозы в среде $0,2, 0,4, 0,8, 2\%$);

Среда 5: Гидролизат (2%), источники азота ($0,3\%$), раствор сахарозы ($0,4\%$), минеральные вещества в виде солей ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 5 \text{ г/л}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 2,0 \text{ г/л}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,1 \text{ г/л}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0,05 \text{ г/л}$).

Культивирование проводили при pH $6,5\text{--}7,0$ и температуре 30°C

Гидролизат лигноцеллюлозной биомассы кукурузы представляет собой продукт хемоферментативной деструкции биополимеров целлюлозы и гемицеллюлозы клеточной стенки (стебель и листья) кукурузы после предварительной водной экстракции сахарозы [13]. Концентрация РВ гидролизата составляет $3\text{--}4\%$ и представлена преимущественно глюкозой, арабинозой и ксилозой.

В качестве белкового источника азота применяли стерильный раствор дрожжевого экстракта (ТУ 9385-007-39184474-2003) и пептона (ГОСТ 13805-76) в соотношении $1:1$ с массовой долей азота не менее $1,5\%$. В качестве небелкового азота применяли раствор сульфата аммония

(ГОСТ 9097-82) и ацетата аммония (ГОСТ 3117-78) также в соотношении 1:1. Сахарозу (ГОСТ 583375) вводили в состав питательной среды в виде стерильного раствора с концентрацией 20%.

Оптимизацию режимов культивирования проводили регулированием уровней pH (4, 5, 6, 7, 8) и температуры (25, 30, 35°C). Уровень pH регулировали добавлением фосфатного и ацетатного буфера с соответствующими значениями pH (4, 5, 6, 7, 8).

Процесс культивирования проводили в инкубаторе ES-20 в течении 48 часов.

Контролируемые параметры процесса – изменение оптической плотности (ОП), РВ, концентрация полисахарида, выход бактериальной биомассы.

Прирост биомассы: измеряется турбидиметрическим методом при длине волны 650 nm, калиброванному по сухому весу клеток. Изменение 1 Ед. оптической плотности при 650 nm эквивалентно 0,4 г сухого вещества в литре [10].

pH питательной среды определяли рН-метром 150-МИ («Аналит-Нева» г. Санкт-Петербург)

Концентрация внеклеточного полисахарида: Нерастворимые полисахариды (**нп**) и бактериальную биомассу отделяли в поле центробежных сил. Для этого 5 мл культуральной жидкости обрабатывали на центрифуге в течении 10 мин при 8 тыс. оборотов/мин. К полученному осадку добавляли раствор соляной кислоты для проведения кислотного гидролиза. В гидролизате определяли содержание редуцирующих веществ (**РВ_{нп}**).

В культуральной жидкости (**кж**) после центрифугирования определяли остаточное содержание редуцирующих веществ (**РВ_{кж}**).

Растворимые полисахариды (**рп**) в культуральной жидкости после центрифугирования определяли добавлением этилового или изопропилового спирта (соотношения культуральная жидкость: спирт 1:3) с последующей декантацией после 12 часов выдержки при температуре 8°C. В полученном осадке после соответствующего кислотного гидролиза также определяли содержание редуцирующих веществ (**РВ_{рп}**).

Кислотный гидролиз осуществляли добавлением 1 мл 2 н HCl к исследуемому образцу и выдерживанием его на кипящей водяной бане в течение 30 мин для гидролиза полисахаридов. После нейтрализации в полученном гидролизате определяли концентрацию РВ.

Концентрацию редуцирующих веществ (РВ) определяли динитросалициловым методом: к 120 мкл исследуемой пробы после центрифугирования добавляли 1200 мкл дистиллированной

воды и 600 мкл динитросалицилдовой кислоты (DNSA). Пробы ставили на 10 мин в водяную баню на 100°C затем на 5 мин в баню при 0°C. Затем во все пробы добавляли по 6 мл дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при 540 nm. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Параметры роста периодической культуры оценивали по удельной скорости роста и выходу биомассы согласно рекомендациям [14].

Результаты и обсуждения

Изучение процесса культивирования на гидролизате с различной концентрацией РВ (0,5, 1, 2, 3%) без внесения других компонентов (**среда 1**) показало, что максимальный прирост биомассы наблюдается при концентрации РВ в питательной среде 0,5 и 1% (таблица 1). Однако, максимальная удельная скорость роста микроорганизмов отмечается при концентрации РВ 2%. С повышением концентрации РВ в питательной среде наблюдается снижение выхода биомассы и ассимиляции ими РВ (РВ_{кж}).

При концентрации РВ 2 и 3% заметно накопление растворимых полисахаридов (РВ_{рп}).

Таким образом, оптимальная концентрация РВ гидролизата в условиях данного эксперимента составляет 0,5–2%, при этом максимальный выход биомассы от РВ отмечен при 0,5%, а максимальная скорость роста и концентрация полисахарида в культуральной жидкости, соответственно, при 2% РВ.

Добавление к гидролизату с концентрацией РВ 2% белковых источников азота (концентрация азота в среде 0,15, 0,3, 0,4, 0,6%) в виде белкового концентрата (**среда 2**) способствовало существенному приросту биомассы и повышению ассимиляции РВ (таблица 2). Максимальный выход биомассы (5,8%) происходит при наибольшей концентрации белкового азота в среде (0,6%), однако при этом высока и остаточная концентрация РВ в культуральной жидкости. Удельные скорости роста микроорганизмов близки для всех концентраций азота в среде.

Накопление внеклеточных полисахаридов смещается в сторону нерастворимой фракции (РВ_{нп}), при этом максимальное количество полисахаридов соответствует максимальному количеству азота в среде.

Замена белковых источников азота на небелковые в той же концентрации (концентрация азота в среде 0,15, 0,3, 0,4, 0,6%) (**среда 3**) также приводит к повышению прироста биомассы при повышении концентрации азота, однако заметно ниже в сравнении с органическими источниками среды 2 (таблица 3). При концентрации азота 0,4%, прирост биомассы и выход биомассы от РВ меньше, практически,

в два раза, чем при концентрации азота 0,15%, тогда как остаточные концентрации РВ в культуральной жидкости (РВкж) довольно близки. Максимальный выход биомассы от РВ и максимальная удельная скорость роста соответствуют концентрации небелкового азота в среде 0,15%.

Как и на среде 2 накопление полисахаридов связано с биомассой, отделяемой центрифугированием (РВнп).

Добавление в питательную среду гидролизата (2% РВ) сахарозы (концентрация сахарозы 0,2, 0,4, 0,8, 2%) и при наличии в среде органического азота (0,3%) – *среда 4*, существенно интенсифицировало процесс с образованием значительного количества бактериальной биомассы при повышенном потреблении РВ (таблица 4). Как известно, сахароза является индуктором синтеза внеклеточного полисахарида бактериями *Leuconostoc*. Примерно через 12 часов культивирования на поверхности культуральной жидкости формировалась устойчивая пленка, образуя к концу культивирования плотный слой с высокой адгезией к стенкам колбы.

Максимальный прирост биомассы и наибольшая удельная скорость роста наблюдаются при концентрациях сахарозы 0,2 и 2% (таблица 4). Выход биомассы при этих значениях сахарозы составляет 9,3 и 7,6% соответственно.

Данным концентрациям сахарозы (0,2 и 2%) характерно накопление как нерастворимой (РВнп), так и растворимой фракции полисахаридов (РВрп).

Добавление минеральных веществ в виде солей (Na_2HPO_4 – 5 г./л, K_2HPO_4 – 2,0 г./л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 г./л; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г./л), к питательной среде, состоящей из гидролизата (2% РВ), азота (0,3%), сахарозы (0,2%), *среда 5*, положительно сказываются на приросте биомассы бактерий и степени усвоения РВ питательной среды. Наибольшему выходу биомассы (8,5%) способствовало введение в состав среды фосфата натрия, при этом минимальная остаточная концентрация РВ культуральной жидкости (РВкж) отмечается при содержании в среде фосфата калия (таблица 5) Значения удельных скоростей роста во всех образцах близки друг к другу.

Таблица 1.

Эффективность культивирования бактерий на среде 1

Table 1

Microbial growth parameters in medium 1

РВ нач, % RSm, %	РВ кж, %, RSr, %	РВ нп, %, RSip, %	РВ рп, %, RSSp, %	Прирост биомассы, г/л, Growth of biomass, g/l	Выход биомассы от РВ, % Yield of biomass from RSst, %	Уд. скор. роста, $\mu\text{ч}^{-1}$ Specific growth rates, μh^{-1}
0,5	0,36 \pm 0,002*	0,007 \pm 0,001	0,065 \pm 0,010	0,147 \pm 0,012	2,9	0,038 \pm 0,0053
1,0	0,85 \pm 0,063	0,050 \pm 0,020	0,157 \pm 0,017	0,280 \pm 0,033	2,3	0,050 \pm 0,0079
2,0	1,20 \pm 0,159	0,096 \pm 0,028	0,324 \pm 0,042	0,376 \pm 0,023	1,9	0,052 \pm 0,0098
3,0	0,45 \pm 0,124	0,080 \pm 0,019	0,252 \pm 0,013	0,216 \pm 0,030	0,7	0,035 \pm 0,0124
4,0	2,15 \pm 0,180	0,086 \pm 0,040	0,120 \pm 0,022	0,114 \pm 0,016	0,3	0,016 \pm 0,0028

*при $P > 95$

Примечание: РВ_{нач}, % – начальная концентрация РВ в среде; РВ_{кж}, % – концентрация РВ в культуральной жидкости после отделения биомассы; РВ_{кж}/РВ_{нач}, % – доля неусвоенного РВ в культуральной жидкости; РВ_{нп}, % – концентрация РВ в нерастворимом осадке после отделения биомассы; РВ_{ро}, % – концентрация РВ в растворимом осадке после осаждения спиртом культуральной жидкости.

Note: RSm, % – initial concentration of reducing sugars in the medium; RSr – the residual concentration of reducing sugars in the medium; RSip, % – reducing sugars in insoluble polysaccharides; s; RSSp, % – reducing sugars in soluble polysaccharides

Таблица 2.

Эффективность культивирования бактерий на среде 2

Table 2.

Microbial growth parameters in medium 2

Концентр. азота, % Nitrogen concentration, %	РВ кж, %, RSr, %	РВ нп, %, RSip, %	РВ рп, %, RSSp, %	Прирост биомассы, г/л, Growth of biomass, g/l	Выход биомассы от РВ, % Yield of biomass from RSst, %	Уд. скор. роста, $\mu\text{ч}^{-1}$ Specific growth rates, μh^{-1}
0,15	0,102 \pm 0,005	0,257 \pm 0,029	0,182 \pm 0,010	0,816 \pm 0,024	4,1	0,051 \pm 0,021
0,3	0,207 \pm 0,096	0,433 \pm 0,193	0,157 \pm 0,023	0,937 \pm 0,035	4,7	0,053 \pm 0,016
0,4	0,157 \pm 0,039	0,498 \pm 0,206	0,207 \pm 0,033	0,905 \pm 0,033	4,5	0,054 \pm 0,024
0,6	0,282 \pm 0,076	0,608 \pm 0,196	0,257 \pm 0,018	1,165 \pm 0,161	5,8	0,057 \pm 0,029

Таблица 3.

Эффективность культивирования бактерий на среде 3

Table 3.

Microbial growth parameters in medium 3

Концентр. азота, % Nitrogen concentration, %	PB кж, %, RSr, %	PB нп, %, RSip, %	PB рп, %, RSsp, %	Прирост биомассы, г/л, Growth of biomass, g/l	Выход биомассы от PB, % Yield of biomass from RSst, %	Уд. скор. роста, μ , $ч^{-1}$ Specific growth rates, μ , h^{-1}
0,15	0,345 \pm 0,029	0,174 \pm 0,021	0,096 \pm 0,029	1,411 \pm 0,182	7,1	0,0840 \pm 0,010
0,3	0,357 \pm 0,109	0,214 \pm 0,074	0,107 \pm 0,013	0,973 \pm 0,012	4,9	0,0746 \pm 0,020
0,4	0,300 \pm 0,057	0,389 \pm 0,092	0,082 \pm 0,020	0,506 \pm 0,104	2,5	0,0574 \pm 0,013
0,6	0,408 \pm 0,044	0,339 \pm 0,024	0,145 \pm 0,028	0,416 \pm 0,074	2,1	0,0448 \pm 0,011

Таблица 4.

Эффективность культивирования бактерий на среде 4

Table 4.

Microbial growth parameters in medium 4

Концентр сахарозы, % sucrose concentration, %	PB кж, %, RSr, %	PB нп, %, RSip, %	PB рп, %, RSsp, %	Прирост биомассы, г/л, Growth of biomass, g/l	Выход биомассы от PB, % Yield of biomass from RSst, %	Уд. скор. роста, μ , $ч^{-1}$ Specific growth rates, μ , h^{-1}
0,2	0,207 \pm 0,021	0,558 \pm 0,021	0,182 \pm 0,015	1,868 \pm 0,011	9,3	0,070 \pm 0,011
0,4	0,332 \pm 0,018	0,383 \pm 0,077	0,220 \pm 0,035	1,461 \pm 0,092	7,3	0,064 \pm 0,013
0,8	0,52 \pm 0,099	0,383 \pm 0,051	0,282 \pm 0,031	1,229 \pm 0,013	6,1	0,060 \pm 0,008
2,0	0,580 \pm 0,050	0,433 \pm 0,104	0,308 \pm 0,033	1,522 \pm 0,065	7,6	0,065 \pm 0,018

Таблица 5.

Эффективность культивирования бактерий на среде 5

Table 5.

Microbial growth parameters in medium 5

Источник минеральных в-в Source of minerals	PB кж, %, RSr, %	PB нп, %, RSip, %	PB рп, %, RSsp, %	Прирост биомассы, г/л, Growth of biomass, g/l	Выход биомассы от PB, % Yield of biomass from RSst, %	Уд. скор. роста, μ , $ч^{-1}$ Specific growth rates, μ , h^{-1}
MnSO ₄ H ₂ O	0,270 \pm 0,023	0,790 \pm 0,087	0,583 \pm 0,076	1,416 \pm 0,096	7,4	0,0517 \pm 0,021
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,370 \pm 0,045	0,840 \pm 0,054	0,395 \pm 0,023	1,474 \pm 0,082	7,1	0,0527 \pm 0,015
Na ₂ HPO ₄	0,250 \pm 0,038	0,414 \pm 0,030	0,157 \pm 0,009	1,708 \pm 0,089	8,5	0,0562 \pm 0,023
K ₂ HPO ₄	0,196 \pm 0,039	0,560 \pm 0,041	0,383 \pm 0,077	1,416 \pm 0,079	7,1	0,0517 \pm 0,013

Таблица 6.

Эффективность культивирования бактерий при различном pH

Table 6.

Microbial growth parameters at different pH

pH	PB кж, %, RSr, %	Выход биомассы от PB, % Yield of biomass from RSst, %	Уд. скор. роста, μ , $ч^{-1}$ Specific growth rates, μ , h^{-1}
4,0	2,07 \pm 0,034	0,2	0,0052 \pm 0,0011
5,0	2,4 \pm 0,028	0,3	0,0077 \pm 0,0011
6,0	0,32 \pm 0,032	5,0	0,0640 \pm 0,0139
7,0	0,28 \pm 0,046	6,1	0,0671 \pm 0,0113
8,0	0,38 \pm 0,033	3,1	0,0417 \pm 0,0059

Эффективность культивирования бактерий при различной температуре

Table 7.

Microbial growth parameters at different temperatures

Температура, °C Temperature, °C	РВ кж, % RSr, %	Выход биомассы от РВ, % Yield of biomass from RSst, %	Уд. скор. роста, μ Specific growth rates, μ, h ⁻¹
25,0	0,284 ± 0,035	4,6	0,0505 ± 0,0011
30,0	0,217 ± 0,039	6,8	0,0671 ± 0,0136
35,0	0,163 ± 0,029	5,0	0,0583 ± 0,0066

Добавление минеральных веществ к питательной среде значительно увеличило накопление нерастворимых (РВнп) и растворимых (РВрп) полисахаридов. При этом, максимальное количество нерастворимой фракции – РВнп образуется на среде с добавлением магния (0,84%), тогда как растворимых полисахаридов РВрп больше всего образуется на среде с марганцем (0,583%).

Значение pH культуральной жидкости имеет определяющее значение в процессе культивирования бактерий *Leuconostoc*. Культивирование при различных значениях pH (4, 5, 6, 7, 8) на питательной среде из гидролизата (РВ 2%), органического азота (0,3%) и сахарозы (0,2%) показало (таблица 5), что при pH 4 и 5 значения РВ выше исходного. Вероятно, это связано с тем, что при pH 5–5,5 бактерии *Leuconostoc* максимально проявляют активность фермента декстрансахарара, гидролизующего сахарозу. Оптимум для развития биомассы и потребление РВ находится в диапазоне pH 6 и 7. Микроорганизмы способны также развиваться и при более высоких значениях (pH 8 и выше), однако продолжительность процесса заметно возрастает. Максимальный выход биомассы (6,1%) и наибольшая удельная скорость роста соответствуют значению

pH 7. Высокая остаточная концентрация РВ в культуральной жидкости (120%) характерна при pH 5, наименьшая (14%) – при pH 7.

Культивирование при различных значениях температуры (25, 30, 35°C) на среде из гидролизата (2%), органического азота (0,3%) и сахарозы (0,2%) и pH около 7 показало, что бактерии *Leuconostoc* интенсивно развиваются при 30 и 35°C. При 35°C к 48 ч наблюдается рост значений pH, характерный при гибели клеток. Максимальный выход биомассы (6,8%), как и удельная скорость роста наблюдаются при температуре 30°C

Выводы

Полученные экспериментальные данные показывают, что при наличии необходимых факторов роста микроорганизмы *Leuconostoc* могут эффективно развиваться на гидролизате лигноцеллюлозной биомассы кукурузы и синтезировать на этих питательных средах внеклеточные полисахариды. Последующие исследования предполагаются направить на изучение химического состава, строения и свойств внеклеточного полисахарида и их взаимосвязь с параметрами культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Mundt J.O. Lactic Acid Bacteria Associated with Raw Plant Food Material. // J. Milk Food Technol. 1970. №33. P. 550–553
- 2 Gordana R. Dimich Characteristics of the *Leuconostocmesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables // APTEFF. 2006. №37. P. 1–192
- 3 Kim Yu Jin¹, Hyun-Ju Eom, Eun-Young Seo, Dong Yup Lee et al. Development of a Chemically Defined Minimal Medium for the Exponential Growth of *Leuconostocmesenteroides* ATCC8293 // J. Microbiol. Biotechnol. 2012. № 22(11). P. 1518–1522
- 4 Server-Busson C., Foucaud C., Leveau J. – Y. Selection of Dairy *Leuconostoc* Isolates for Important Technological Properties. // J. Dairy Res. 1999. №66. P. 245–56.
- 5 Hemme D., Foucaud-Scheunemann C. *Leuconostoc*: Characteristics, Use in Dairy Technology and Prospects in Functional Foods. // International Dairy Journal. № 200414. P. 467–494.

- 6 Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavours profiling of cheese products. // FEMS Microbiol. Rev. 2005. № 29. P. 591–610

- 7 Lacaze G., Wick M., Cappelle S. Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs // Food Microbiology. 2007. № 24. P. 155–160.

- 8 Diana C.R., Humberto H.S., Jorge Y.F. Probiotic Properties of *Leuconostocmesenteroides* Isolated from Aguamiel of Agave salmiana. // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2015. №7(2). P. 107–17

- 9 Garvie E.I. Genus *Leuconostoc*. // Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1071–1075.

- 10 Dols S M., Chraibi W., Remaud-Simeon M., Lindley N.D. et al. Growth and Energetics of *Leuconostocmesenteroides* NRRL B-1299 during Metabolism of Various Sugars and Their Consequences for Dextranucrase Production // Applied and Environmental Microbiology. 1997. V. 63. № 6. P. 2159–2165

11 Santos M., Teixeira J., Rodrigues A. Production of dextranase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f) // Biochemical Engineering Journal. 2000. P. 4177–188

12 Foucaud C., Francois A., Richard J. Development of a Chemically Defined Medium for the Growth of *Leuconostoc mesenteroides* // Applied And Environmental Microbiology. Jan. 1997. V. 63. № 1. P. 301–304

13 Хусаинов И.А. Конверсия лигноцеллюлозной биомассы кукурузы в простые сахара. // Прикладная Биотехнология. 2017.

14 Гаретова Л.А. Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования: методические указания к выполнению лабораторной работы. Хабаровск: Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2010. 16 с.

REFERENCES

1 Mundt J.O. Lactic Acid Bacteria Associated with Raw Plant Food Material. *J. Milk Food Technol.* 1970. no. 33. pp. 550–553

2 Gordana R. Dimich Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables APTEFF. 2006. no. 37. pp. 1–192

3 Kim Yu Jin1, Hyun-Ju Eom, Eun-Young Seo, Dong Yup Lee et al. Development of a Chemically Defined Minimal Medium for the Exponential Growth of *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. no. 22(11). pp. 1518–1522

4 Server-Busson C., Foucaud C., Leveau J. – Y. Selection of Dairy *Leuconostoc* Isolates for Important Technological Properties. *J. Dairy Res.* 1999. no. 66. pp. 245–56.

5 Hemme D., Foucaud-Scheunemann C. *Leuconostoc*: Characteristics, Use in Dairy Technology and Prospects in Functional Foods. *International Dairy Journal.* no. 200414. pp. 467–494.

6 Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavours profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev.* 2005. no. 29. pp. 591–610

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Инназар А. Хусаинов ассистент, кафедра пищевой инженерии малых предприятий (ПИМП), Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. К. Маркса, 68, г. Казань, 420015, Республика Татарстан, Россия, Fortes16@yandex.ru

Альберт В. Канарский д.т.н., профессор, кафедра пищевой биотехнологии, Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. К.Маркса, 68, г. Казань, 420015, Республика Татарстан, Россия, alb@mail.ru

КРИТЕРИЙ АВТОРСТВА

Инназар А. Хусаинов Обзор литературы, проведение эксперимента, написал статью, несет ответственность за плагиат

Альберт В. Канарский научный руководитель, консультации в ходе исследования

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ПОСТУПИЛА 03.07.2018

ПРИНЯТА В ПЕЧАТЬ 15.08.2018

7 Lacaze G., Wick M., Cappelle S. Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs, *Food Microbiology.* 2007. no. 24. pp. 155–160.

8 Diana C.R., Humberto H.S., Jorge Y.F. Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of Agave salmiana. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2015. no.7(2). pp. 107–17

9 Garvie E.I. Genus *Leuconostoc*. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. p. 1071–1075.

10 Dols S M., Chraibi W., Remaud-Simeon M., Lindley N.D. et al. Growth and Energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during Metabolism of Various Sugars and Their Consequences for Dextranase Production. *Applied and Environmental Microbiology.* 1997. vol. 63. no. 6. pp. 2159–2165

11 Santos M., Teixeira J., Rodrigues A. Production of dextranase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f). *Biochemical Engineering Journal.* 2000. pp. 4177–188

12 Foucaud C., Francois A., Richard J. Development of a Chemically Defined Medium for the Growth of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied And Environmental Microbiology.* Jan. 1997. vol. 63. no. 1. pp. 301–304

13 Khusainov I.A. Conversion of lignocellulosic corn biomass to simple sugars. *Prikladnaya biotekhnologiya* [Applied Biotechnology]. 2017. (in Russian)

14 Garetova L.A. Otsenka parametrov rosta mikroorganizmov v usloviakh periodicheskogo i nepreryvnogo kultivirovaniia metodicheskie ukazaniia k vypolneniiu laboratornoi raboty [Estimation of growth parameters of microorganisms under conditions of periodic and continuous cultivation: methodological instructions for performing laboratory work] Khabarovsk, Tikhook. state. University. 2010. 16 pp. (in Russian)

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Innazar A. Khusainov assistant, food engineering in small enterprises department, Kazan national research technological university, K. Marks st. 68, 420015, Russia, Fortes16@yandex.ru

Albert V. Kanarskiy Dr. Sci. (Engin.), professor, department of food biotechnology, Kazan national research technological university, K. Marks st. 68, 420015, Russia, alb@mail.ru

CONTRIBUTION

Innazar A. Khusainov review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, wrote an article, take responsibilities for plagiarism

Albert V. Kanarskiy scientific director consultation during the studies

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

RECEIVED 7.3.2018

ACCEPTED 8.15.2018