

ПОЛУЧЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ПУТЁМ ГЛУБИННОГО  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *RHIZOPUS ORYZAE*

Беляева И.Д. (СПбГТИ (ТУ)), Беляева А.Д. (СПбГТИ (ТУ))

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Няникова Г.Г.  
(СПбГТИ (ТУ))

**Введение.** Молочная кислота – продукт, широко используемый в пищевой и других отраслях промышленности. Она может быть получена биотехнологическим путём с использованием таких её продуцентов, как бактерии и грибы. Продукт бактериальной ферментации в основном представляет собой смесь как *L(+)*-, так и *D(-)*-изомеров, хотя существуют некоторые штаммы, способные производить оптически чистую *D(-)*-молочную кислоту при определённых условиях [1]. Преимущество получения молочной кислоты с использованием культур грибов – в их способности образовывать исключительно *L(+)*-изомер молочной кислоты.

Гриб *Rhizopus oryzae* – перспективный продуцент многих ценных продуктов, в том числе различных органических кислот: молочной, фумаровой, яблочной, лимонной и др. Он способен конвертировать глюкозу в молочную кислоту в аэробных условиях, в то время как при ограниченных концентрациях кислорода в культуральной среде он увеличивает производство этанола [2-4]. Гриб может также использовать крахмал непосредственно для производства молочной кислоты. Помимо этого, он является продуцентом амилолитических ферментов, поэтому способен расщеплять крахмал до легко усвояемой глюкозы [5].

Анализ органических кислот актуален на всех этапах оптимизации процесса их продуцирования микроорганизмами. Наличие или отсутствие данных кислот в пробе, а также их количественное содержание и соотношение позволяют контролировать ферментативные процессы и оптимизировать их с получением более высоких выходов целевого продукта.

**Основная часть.** Целью данной работы было определение влияния температуры на продукцию молочной кислоты при культивировании гриба *Rhizopus oryzae*.

Для её достижения были поставлены следующие задачи:

- 1) культивирование *Rhizopus oryzae* при различных температурах,
- 2) определение концентрации молочной кислоты в культуральной жидкости после отделения биомассы.

Объектом исследования являлся гриб *Rhizopus oryzae* (Went et Prinsen-Geerligs 1895), регистрационный номер Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов F-814. Особенности штамма является способность продуцировать  $\alpha$ -амилазу, глюкоамилазу и непатогенным для человека, согласно классификации микроорганизмов, приведённой в Санитарных правилах СП 1.3.2322-08. Работа с *R. oryzae* F-814 не требует специальных мер предосторожности.

Музейную культуру гриба *Rhizopus oryzae* из коллекции кафедры технологии микробиологического синтеза СПбГТИ (ТУ) пересеивали 1 раз в 2 месяца на скошенном гороховом агаре с добавками глюкозы (5 г/л) и аммония сульфата (10 г/л).

Для получения посевного материала *R. oryzae* пересеивали в пробирки, куда предварительно вносили 5 мл плотной агаризованной среды на гороховом отваре с такими же добавками глюкозы и аммония сульфата (см. выше) и выращивали при температуре (28 – 30) °С в течение 3 суток. Пробирки с посевным материалом хранили в холодильнике при температуре (2 – 8) °С.

Для проведения глубинного культивирования использовали жидкую питательную среду на основе гороха следующего состава (г/л): горох – 50, глюкоза – 5,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 10,0.

Горох замачивали в холодной водопроводной воде на 12 часов при температуре от 2 до 8 °С с целью экстрагирования водорастворимых питательных компонентов и уменьшения

времени варки; затем нагревали до кипения (LU-3631, Lumme, Китайская Народная Республика). Упаренные отвары фильтровали через марлю и измеряли объём с помощью мерного цилиндра. В случае, если объём был менее требуемого, его доводили водой водопроводной до метки; если более, то переливали обратно в кастрюлю и продолжали упаривание. Затем разливали в стерильные колбы Эрленмейера вместимостью 250 мл.

Споры или мицелий гриба *R. oryzae* смывали со скошенной агаризованной среды 2 мл дистиллированной воды в колбы с заранее приготовленными питательными средами из расчёта одна пробирка на одну колбу.

Культивирования проводили с использованием шейкера-инкубатора (ES-60, MUILAB, Китайская Народная Республика) при температурах 15, 20, 25 и 30 °С в течение 3 суток при скорости вращения 250 об/мин. Объём культивирования составил 50 мл.

Содержание органических кислот в культуральной жидкости определяли методом капиллярного электрофореза с использованием прибора «Капель-105М» (ООО «Люмекс», Российская Федерация) и специализированного программного обеспечения «Elforun».

Так, температурами, наиболее благоприятными для продукции молочной кислоты грибом *R. oryzae*, являются 15 и 20 °С, её концентрации в культуральной жидкости составили соответственно  $(391,2 \pm 39,1)$  мг/л и  $(452,8 \pm 39,8)$  мг/л. При более высоких температурах продукция молочной кислоты сильно снижается: при 30 °С её концентрация в культуральной жидкости составила  $(241,7 \pm 25,6)$  мг/л, а при 25 °С молочная кислота не была детектирована прибором.

Снижение продукции молочной кислоты при 25 °С может быть обусловлено перераспределением метаболических потоков в сторону биосинтеза клеточной массы. При более высоких температурах гриб *Rhizopus oryzae* может отдавать приоритет увеличению биомассы, но снижать выход вторичных метаболитов, в частности, молочной кислоты. Вероятно, метаболическая активность, направленная на продукцию органических кислот, регулируется температурозависимыми ферментативными системами, и при 25 °С условия менее благоприятны для накопления молочной кислоты, что подтверждается её отсутствием в культуральной жидкости.

**Выводы.** Проведены культивирования гриба *Rhizopus oryzae* при различных температурах, определены концентрации молочной кислоты в культуральной жидкости после отделения биомассы. Оптимальной температурой для её продукции в рамках проведённой работы признана 20 °С –  $(452,8 \pm 39,8)$  мг/л. При 25 °С молочная кислота не детектировалась, а при 30 °С её концентрация была значительно ниже, чем при 20 °С, что может быть связано с перераспределением метаболических потоков в сторону роста биомассы или снижением активности ферментов.

#### **Список использованных источников:**

1. Sun Y., Li Y. L., Bai S. Modeling of continuous L(+)-lactic acid production with immobilized *R. oryzae* in an airlift bioreactor // Biochemical Engineering Journal. – 1999. – Vol. 3. – №. 1. – P. 87-90.

Яникова, Г. Г. Сорбционные свойства гриба *Rhizopus oryzae* // Известия СПбГТИ (ТУ). –

омиссарчик, С. М. Получение биосорбентов для выявления синтетических пищевых красителей в напитках: дис. ... канд. техн. наук: 03.01.06 / С.М.Комиссарчик. – СПб., 2011. – 170 с.

. Longacre, et al. Flux analysis of glucose Metabolism in *Rhizopus oryzae* for purpose of increasing lactate yields // Fungal Genetic Biology. – 1997. – №. 21. – P. 30-39.

Яникова, Г. Г., Комиссарчик, С. М., Хрусталева, М. В. Исследование условий культивирования *Rhizopus oryzae* для получения молочной кислоты и биосорбента // Известия СПбГТИ (ТУ). – 2012. – №. 17. – С. 056-060.