

УДК 576.852.24.095

ПРОДУЦИРОВАНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

А. Л. ПЕРЕВЕРЗЕВА, Л. И. ВОРОБЬЕВА

(Кафедра микробиологии)

С целью совершенствования технологии микробиологического производства пропионовой кислоты — ценного консерванта зерна, силоса и пищевых продуктов — необходимо дальнейшее изучение метаболизма ее продуцентов, условий культивирования последних.

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме иммобилизации клеток микроорганизмов и использованию таких клеток для трансформации и биосинтеза различных веществ, в том числе органических кислот.

Иммобилизация клеток — один из путей получения активной полиферментной системы, осуществляющей как одностадийные процессы микробиологических превращений, так и многостадийные. Эта система с успехом заменяет иммобилизованные ферменты, которые вследствие их пространственной разобщенности в полиферментных системах обычно малоэффективны.

Об иммобилизации клеток пропионовокислых бактерий имеются лишь единичные данные. Поэтому перед нами стояла задача выяснить возможность синтеза пропионовой кислоты пропионовокислыми бактериями в условиях иммобилизации, изучить в

динамике интенсивность образования органических кислот иммобилизованными и свободными клетками на различных субстратах.

Материалы и методы

Объектами исследования служили следующие культуры пропионовокислых бактерий: *Propionibacterium shermanii*, *P. agabiposum*, *P. technicum* и пропионовокислые кокки.

В настоящей работе пропионовокислые бактерии нас интересовали с точки зрения использования их для получения летучих кислот. Нашей задачей было подобрать дешевый непищевой субстрат для выращивания микроорганизмов. С этой целью применяли среды с лактозной сывороткой в качестве источника углерода, а также с гидролизатом соломы, полученным при использовании фермента, выделенного из гриба рода *Aspergillus*. Бактерии выращивали в жидкой среде следующего состава.

Среда А: глюкоза — 2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,3; кукурузный экстракт — 2%.

Среда Б: лактозная сыворотка — 5,6% (содержание лактозы 71%, жира — 0,7—

1,5, белка — 12,5, минеральных веществ — 5,3 %); кукурузный экстракт — 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,3 %.

Среда В: гидролизат соломы, содержащий 1,3 % глюкозы; кукурузный экстракт — 0,3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,195 %. Во всех опытных средах содержание CoCl_2 составило 10 мг/л, pH 6,8. Среда В приготавливалась в трех вариантах, различающихся по способу ферментативного гидролиза соломы: 1 — в дистиллированной воде, pH 7; 2 — с добавлением HCl до pH 4; 3 — в цитратном буфере, pH 5,9.

Контролем служила среда, содержащая 1,3 % глюкозы. Имобилизованные, или свободные, клетки (2 г) помещали в 100 мл инкубационного раствора, содержащего 2 % глюкозу в 0,5-молярном K, Na фосфатном буфере (pH 7,0) с 0,1 % MgSO_4 .

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера в стационарных условиях (температура 30°) в течение 48—60 ч, что соответствовало экспоненциальной фазе роста, до полного использования субстрата. Каждые 24 ч pH доводили до 6,8, добавляя стерильный 10 % раствор NaHCO_3 . Биомассу культур определяли нефелометрически на спектрофотометре ФЭК-56П при $\lambda=515$ мкм, а также весовым методом.

Имобилизовали по 2 г сырой биомассы клеток каждой культуры, суспензированных в 6 мл буфера, в полиакриламидный гель. При полимеризации использовали 25 % полиакриламида и 10 % сшивающего агента — метиленбисакриламида и катализаторов: N^1 , N^1 , N^2 , N^1 -тетраметилэтилендиамин и персульфат аммония [2].

К 4 мл 25 % раствора акриламида + метилен бисакриламида в соотношении 9 : 1 приливали 5 мл дистиллированной воды, далее при перемешивании добавляли 0,1 мл 100 % тетраметилэтилендиамина и вносили 6 мл суспензии клеток, затем 0,2 мл 25 % раствора $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Полимеризация проводилась при температуре 15—16°. Имобилизация продолжалась 2,5—8 мин. Полученный блок геля растирали через сито и получали гранулы размером 1,5—2 мм, которые промывали 2 ч водопроводной водой, отфильтровывали и использовали для проведения экспериментов.

Количество летучих кислот определяли после отгона их с паром. Титровали 100 мл отгона 0,01 н. NaOH по фенолфталеину. Количество кислот рассчитывали в граммах на 1 л инкубационного раствора, отделенного от биомассы центрифугированием в течение 15 мин при 5000 об/мин.

Количественное разделение летучих кислот проводили на хроматографе АХМ-8М с ионизационно-пламенным детектором. По данным газо-жидкостной хроматографии определяли соотношение пропионовой и уксусной кислот (П : У).

Результаты исследований

Культуры микроорганизмов, которые служили объектами изучения, выделены из сыров. Хорошо изученной является лишь *P. shermanii*, использованная нами в качестве образца. Морфология ее была описана ранее [1].

P. technicum выделен и описан Ван Нилем и представлен палочками, достигающими 3 мкм в длину; клетки иногда искривлены. Колонии блестящие, кремовые, растут в аэробных и анаэробных условиях.

P. arabinosum — палочковидные клетки, разной длины, при нейтральных значениях pH это почти кокки, при подкислении среды — палочки от 2 до 3,5 мкм, часто по две или три в цепочках. Колонии в аэробных условиях желто-оранжевые, в анаэробных — кремовые.

Пропионовокислые кокки выделены из сыров на ранней стадии их созревания. Кокковидная форма сохраняется на всех стадиях роста культуры в аэробных и анаэробных условиях. Диаметр клеток от 0,6 до 1,2 мкм. Колонии светло-бежевого цвета как в аэробных, так и анаэробных условиях. Деление клеток происходит в разных направлениях, при этом часто возникают тетраэдри или соединения клеток в виде «личинки». Пропионовокислые кокки представляют особый интерес, так как в систематических определителях они не описывались.

Установлено, что на среде с глюкозой, лактозой и всех типах сред с гидролизатом соломы логарифмическая фаза роста каж-

Т а б л и ц а 1

Образование кислот пропионовокислыми бактериями на средах с глюкозой и лактозой в качестве источника углерода

Культуры	Глюкоза			Лактоза		
	общее кол-во кислот, г/л	П:У	К:Б	общее кол-во кислот, г/л	П:У	К:Б
<i>P. shermanii</i>	8,80	2,00	3,38	7,90	2,60	3,20
<i>P. technicum</i>	9,80	1,67	3,07	5,00	4,90	1,50
<i>P. arabinosum</i>	9,10	2,60	4,55	7,70	2,56	2,80
Пропионовокислые кокки	9,20	8,10	3,76	7,20	6,10	3,10

Примечание. П : У — соотношение содержания пропионовой и уксусной кислот; К : Б — содержания суммы кислот и биомассы бактерий.

Образование кислот пропионовокислыми бактериями на средах с гидролизатом соломы в качестве источника углерода

Культуры	Среда с глюкозой (контроль)		Среда с гидролизатом соломы					
			1		2		3	
	K _O	K _O :B	K _O	K _O :B	K _O	K _O :B	K _O	K _O :B
<i>P. shermanii</i>	6,00	1,62	12,00	6,30	8,00	2,08	4,70	0,89
<i>P. technicum</i>	4,95	1,98	6,30	2,74	7,00	2,45	5,75	1,66

Пр и м е ч а н и е. 1—3 — модификации среды В; K_O — общее количество кислот; B — биомасса бактерий.

дой культуры заканчивается через 4 сут. Максимальное количество биомассы на среде с глюкозой дает культура *P. technicum* (3,2 г/л). Культура *P. shermanii* наиболее активно накапливает биомассу (5,5 г/л) на среде с гидролизатом соломы (модификация 2), тогда как культура *P. technicum* на средах с гидролизатом соломы дает меньшее количество биомассы, чем на среде с глюкозой.

Как видно из табл. 1, лактоза лактозной сыворотки использовалась всеми четырьмя штаммами бактерий. В результате образовывалось от 5 до 7,9 г органических кислот на 1 л раствора. Максимальное количество органических кислот (7,9 г/л) вырабатывалось *P. shermanii* — продуцентом витамина В₁₂ в промышленности.

На среде с гидролизатом соломы образование кислот отмечено у двух штаммов — *P. shermanii* и *P. technicum* (табл. 2), причем количество органических кислот у первого штамма составляло 12 г/л (больше, чем на среде с глюкозой). При использовании всех типов сред с гидролизатом соломы как для культуры *P. shermanii*, так и *P. technicum* соотношение П:У оставалось постоянным соответственно 2 и 1,67 и не отличалось от такового при использовании среды с глюкозой. На среде с лактозной сывороткой соотношение кислот менялось. Наиболее значительные изменения этого соотношения наблюдались у пропионовокислых кокков (с 8,1 и 6,1) и *P. technicum* (1,67 и 4,9).

Пропионовокислые кокки представляют несомненный интерес как продукты пропионовой кислоты (отношение П:У при их использовании около 8). Химизм брожения в этом случае, по-видимому, отличается от классического пропионовокислого брожения.

Нами было проведено сравнительное изучение динамики сохранения активности кислотообразования свободными и иммобилизованными клетками каждой из четырех изучаемых культур. В качестве контроля использовали по 2 г необработанной биомассы каждой культуры. Клетки помещали в 100 мл инкубационного раствора и инкубировали при 30° в течение 36 сут, последовательно сменяя инкубационный раствор каждые 48 ч.

Потеря активности кислотообразования в результате иммобилизации разных культур несколько варьировала.

В случае *P. shermanii* она составляла 79 % от контроля, *P. technicum* — 82, *P. arabinosum* — 90, пропионовокислых кокков — 73 %. Было установлено, что свободные и иммобилизованные клетки каждой из культур в равных условиях инкубации проявляют сходную динамику сохранения активности лишь на ранних этапах (1—7-е сут). Далее кислотообразующая активность свободных клеток во всех случаях продолжала снижаться, а иммобилизованных клеток всех культур возрастала и на 18-е сут составляла для *P. shermanii* 100 %, *P. technicum* — 96, *P. arabinosum* — 60, пропионовокислых кокков — 100 %. Активность кислотообразования иммобилизованных клеток продолжала снижаться до 28-х сут, а затем вновь повышалась. На 33-е сут она составляла: для *P. shermanii* — 14,3 %, *P. technicum* — 13,2, *P. arabinosum* — 14,2, пропионовокислых кокков — 28,6 %, в то время как для иммобилизованных клеток была гораздо выше: у *P. shermanii* — 64,9 %, *P. technicum* — 56,8, *P. arabinosum* — 30,8, пропионовокислых кокков — 81,0 %.

Представляет интерес синхронная осцилляционная активность кислотообразования, характерная для иммобилизованных клеток всех культур. Самый резкий подъем активности кислотообразования отмечался у культуры *P. technicum*, отличающейся наиболее быстрым ростом. Можно полагать, что осцилляционная вызвана так называемым критическим ростом [3], т. е. ростом за счет части лизированных клеток. При этом с повышением скорости роста ускорялось появление такого эффекта.

Пропионовокислые бактерии достаточно устойчивы к компонентам иммобилизующей смеси и в течение длительного времени сохраняют способность образовывать кислоты. Свободные клетки *P. arabinosum* после иммобилизации сохраняют активность на 90 %. Через 36 сут (при смене раствора через 2 сут) активность иммобилизованных клеток изучаемых культур была равна 30—81 % к исходному уровню, тогда как свободных клеток — 13—28 %. Наиболее высокая устойчивость к действию иммоби-

лизующих факторов характерна для *P. agabiposum*, а наибольшей стабильностью отличались пропионовые кокки.

Таким образом, иммобилизация обеспечивает более длительное использование клеток пропионовокислых бактерий. Наибольшее количество кислот в условиях иммобилизации образует культура *P. technicum*.

Выводы

1. Установлена и количественно определена способность представителей 4 видов пропионовокислых бактерий образовывать органические кислоты на средах с гидролизатом соломы и молочной сывороткой в качестве источника углерода.

2. Все испытанные культуры используют

лактозную сыворотку и образуют 5—7,9 г органических кислот на 1 л раствора. Штаммы *P. shermanii* и *P. technicum* растут и продуцируют кислоты на среде с гидролизатом соломы. Причем первый на среде с гидролизатом соломы образует больше кислоты (12 г/л), чем на среде с глюкозой.

3. Пропионовокислые бактерии обладают высокой кислотообразующей способностью после иммобилизации в полиакриламидный гель и сохраняют ее после 36 сут культивирования. Наибольшей стабильностью отличаются пропионовокислые кокки.

Установлена принципиальная возможность получения органических кислот с помощью иммобилизованных клеток пропионовокислых бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Л. И. Пропионовокислые бактерии и образование витамина В₁₂. М.: Изд-во МГУ, 1976. — 2. Скрябин Г. К., Кощенко К. А., Могильницкий Г. М., Суровцев В. И., Тюрин В. С., Фихте В. А. Изучение жизнеспособности и ферментативной активности иммобилизованных клеток микроорга-

низмов, трансформирующих стероиды. — Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, с. 1974, с. 857—859. — 3. Davies B. — The survival of Vegetative Microbes ed. T. R. G. Grey J. R. Rostgate, L.—N. Y.—Melbourne, 1976, p. 19—25.

Статья поступила 3 июля 1981 г.

SUMMARY

The ability of four kinds of propionic acid bacteria to form organic acids in media with hydrolysate of straw and whey as a source of carbon was determined.

The possibility of getting organic acids with the help of immobilized propionic acid bacteria was established.