

Грецький І. О., магістр, Волошина І. М., доц.

Київський національний університет технологій та дизайну

ОПТИМІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ

Анотація. В роботі описано дослідження з оптимізації поживного середовища для вирощування бактерій роду *Lactobacillus*, з метою збільшення виходу молочної кислоти. Оптимізація проводилася за допомогою повнофакторного експерименту з 3 змінними факторами. Статистична обробка результатів проводилася із застосуванням сучасного програмного забезпечення ANOVA, що дозволило виявити значимість впливу кожного фактора та їх взаємодії на продуктивність процесу. Отримані дані демонструють ефективність методики оптимізації поживного середовища для підвищення виходу молочної кислоти, що може сприяти підвищенню рентабельності виробничих процесів у біотехнологічній промисловості.

Ключові слова: *Lactobacillus*, оптимізація, молочна кислота, середовище, кислотність.

Hretskyi I. O., Voloshyna I. M.

Kyiv National University of Technologies and Design

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR LACTIC ACID PRODUCTION

Abstract. The article describes a study on the optimization of the nutrient medium for growing bacteria of the genus *Lactobacillus*, in order to increase the yield of lactic acid. The optimization was carried out using a full-factorial experiment with 3 variable factors. Statistical processing of the results was performed using modern ANOVA software, which made it possible to identify the significance of the influence of each factor and their interaction on the process performance. The data obtained demonstrate the effectiveness of the methodology for optimizing the culture medium to increase the yield of lactic acid, which can contribute to the profitability of production processes in the biotechnology industry.

Keywords: *Lactobacillus*, optimization, lactic acid, medium, acidity.

Вступ. Молочна кислота ($C_3H_6O_3$) – це органічна кислота, яка відіграє важливу роль у біохімічних процесах організмів, а також має широке промислове застосування. Молочна кислота (МК) є природним продуктом анаеробного метаболізму. Науковий інтерес до МК значно зріс у зв'язку з її численними корисними властивостями. Вона широко використовується у харчовій промисловості як натуральний консервант, що подовжує термін придатності продуктів і покращує їх смакові якості [1]. Крім того, МК застосовується у косметичній промисловості для виробництва засобів, що стимулюють оновлення шкіри, а також у фармацевтиці як інгредієнт для кремів та ліків.

Отже, молочна кислота є цінною сполукою як з точки зору біологічних процесів, так і з перспективи сучасних технологічних інновацій. Її роль у метаболізмі людини та у виробництві екологічно чистих матеріалів свідчить про важливість подальших досліджень для розкриття всіх потенційних можливостей цієї речовини [2].

Процес промислового отримання МК має низку труднощів, що обмежують можливість масштабного та економічно вигідного виробництва. Основний метод виробництва молочної кислоти включає біотехнологічний синтез, зазвичай за допомогою молочнокислих бактерій, таких як *Lactobacillus* [3]. Цей процес вимагає специфічних умов, включаючи певний температурний режим, контрольований рівень рН та стерильність, що ускладнює процес виробництва і збільшує його вартість. Однак ефективність процесу синтезу значною мірою залежить від оптимізації умов середовища для забезпечення максимального виходу МК.

Найважливішою стадією у виробництві бактеріальних препаратів на основі молочнокислих бактерій є отримання максимального виходу біомаси за мінімальний термін культивування. Культивування молочнокислих бактерій ускладнено особливостями поживних потреб цих мікроорганізмів. Для цих бактерій необхідна наявність у поживному середовищі факторів росту – амінокислот, вітамінів, мікроелементів тощо, тому питання оптимізації умов культивування бактерій є актуальним [4].

Однією з головних проблем є потреба в дорогих субстратах, таких як глюкоза або мальтоза, що використовуються для ферментації, а також відсутність можливості легко використовувати дешевші сировинні джерела, як-от сільськогосподарські відходи чи відновлювані ресурси. Крім того, біотехнологічне виробництво молочної кислоти потребує ретельного очищення продукту від побічних метаболітів, які можуть негативно вплинути на кінцеву якість та чистоту молочної кислоти.

Пошук оптимального середовища для синтезу МК є не лише економічно вигідним, але й екологічно важливим, оскільки дозволяє скоротити витрати на очищення продукту, зменшити кількість побічних відходів і підвищити загальну ефективність процесу. У зв'язку з цим оптимізація параметрів ферментації є актуальним завданням у сучасній біотехнології, що потребує глибоких досліджень і розробки нових методів контролю умов середовища.

Постановка завдання. Виходячи з вищенаведеного, метою дослідження є оптимізація складу поживного середовища для вирощування молочнокислих бактерій для отримання молочної кислоти за допомогою методів математичного планування експерименту.

Результати досліджень. Було використано ліофілізований штаб *Lactobacillus plantarum* з Української колекції мікроорганізмів Інститута мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для культивування штамів *Lactobacillus plantarum* використовували низку поживних середовищ [6]. Класичним елективним живильним середовищем для вирощування термофільних лактобацил, включаючи *L. plantarum*, є середовище МРС [7]. Для визначення потреби в окремих компонентах поживного середовища під час культивування продуцентів використовували глюкозо-пептодне середовище (ГПС), в якому змінювали джерела, та кількісний склад компонентів.

Якісний склад глюкозо-пептоного живильного середовища (ГПС) є поживною основою для росту бактерій, забезпечуючи їх всіма необхідними речовинами, глюкоза включена як джерело вуглецю, що дозволяє накопичувати широкий спектр мікроорганізмів. Пептон містить жири, метали, солі, вітаміни та багато інших органічних речовин необхідних для росту.

Стандартний склад поживного середовища ГПС, г/л:

Глюкоза	10,0
Пептон	5,0
NaCl	5,0
Вода дистильована	до 1000,0 мл

Для дослідження отриманих зразків були застосовані кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера.

Для оптимізації складу поживного середовища використовувались методи математичної статистики для визначення значущих факторів та оптимальних значень значущих факторів для більш поглибленого вивчення процесу отримання молочної кислоти при культивуванні на ГПС. Накопичення МК оцінювали використовуючи методи регресійного аналізу в теорії планування експерименту по повнофакторному

плану 3³. Статистична обробка даних планованого експерименту (розрахунок коефіцієнтів регресії, дисперсійний аналіз (ANOVA) і побудова поверхонь відгуку проводилась з застосуванням тріал-версії програми Statistica (TIBCO Software Inc., <https://www.tibco.com/>) з використанням бібліотеки DOE. Отримані коефіцієнти вважалися статистично значущими при $p \leq 0,05$ [8]. Поле матриці повнофакторного дослідження було обрано відповідно до фактичних концентрацій. Було проведено 27 варіантів експерименту, кожен з яких означав певну комбінацію факторів оптимізації, де оптимізаційним параметром слугувала концентрація МК в середовищі [9]. Незалежними змінними були наступні фактори: X_1 – концентрація пептону в середовищі, г/л; X_2 – концентрація дріжджового екстракту в середовищі, г/л; X_3 – концентрація цукрів в середовищі, г/л (табл. 1).

Таблиця 1

Фактори математичної моделі

Позначення фактора	Фактор	Мінімальна вартість «-»	Середнє значення «0»	Максимальне значення «+»
X_1	Пептон, г/л	10	15	20
X_2	Дріжджовий екстракт, г/л	10	15	20
X_3	Концентрація цукрів, г/л	20	40	60

Джерело: розраховано авторами

Такий підхід дозволяє оцінити лінійні ефекти впливу факторів (X_1 , X_2 , X_3) на кількість МК (показник Y) і виразити їх у вигляді рівняння регресії в рамках однієї моделі:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \varepsilon, \quad (1)$$

де Y – залежна змінна; β_0 , β_1 , β_2 – коефіцієнти регресії; X_1 , X_2 – незалежні змінні; ε – випадкова похибка.

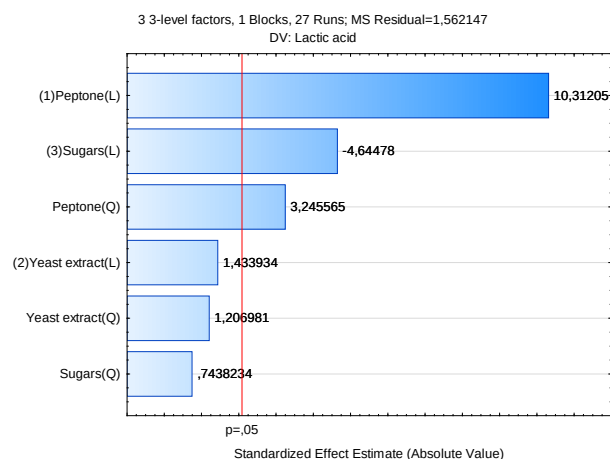
За допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) було встановлено рівень значущості ефектів (лінійний, квадратичний) на кількість МК досліджуваного штаму. Встановлено, що серед досліджуваних факторів оптимізації, суттєво ($p \leq 0,05$) впливали на збільшення МК концентрація пептону в середовищі (X_1) та концентрація цукрів в середовищі (X_3), в той час як концентрація дріжджового екстракту не мала значущого впливу (X_2) ($p \geq 0,05$).

Для оцінки ефектів дисперсійного аналізу наведена діаграма Парето, де ефекти впливу на кількість МК розміщені за абсолютним значенням за спаданням (на рис. 1). Ця діаграма показує, що лінійний ефект концентрації пептону в середовищі має найвищий надійний вплив, а квадратичний ефект концентрації цукрів середовища має найменший надійний вплив.

З отриманої моделі виходить, що концентрація пептону виявилась найбільш важливим фактором, зі збільшенням якого приріст МК у *Lactobacillus plantarum* повинен лінійно збільшуватися.

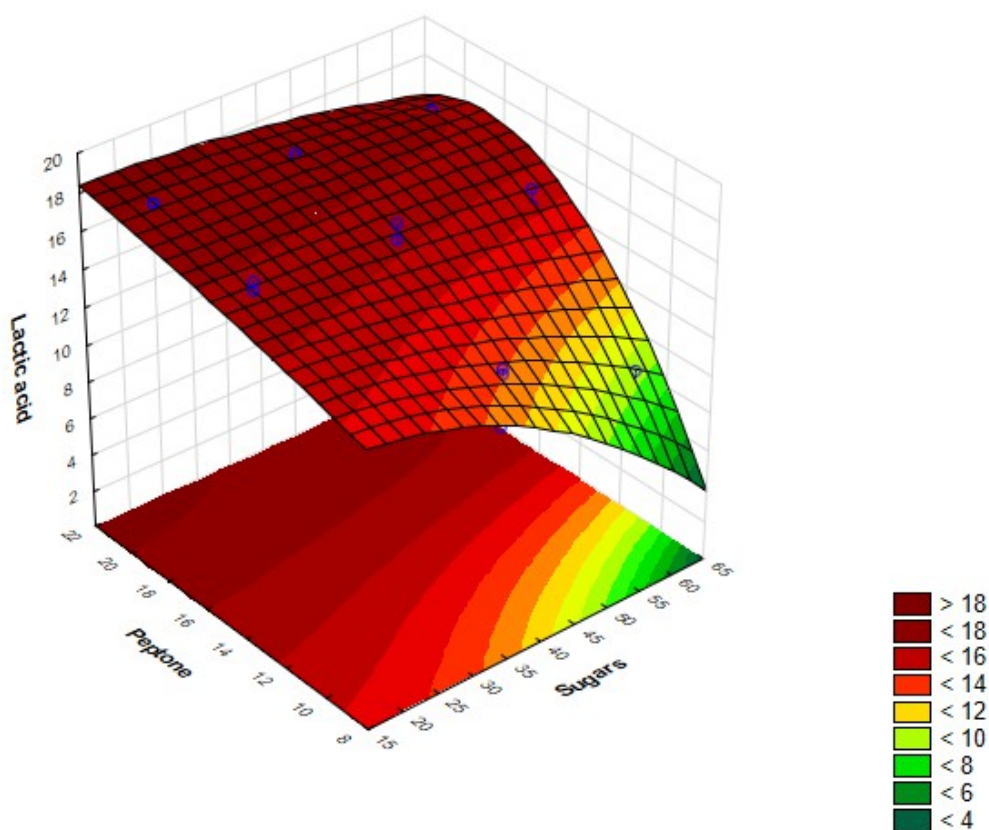
Згідно поверхні відгуку приросту МК від досліджуваних факторів (цукри та пептон) негативний вплив має збільшення концентрації цукрів в поживному середовищі (рис. 2).

Згідно отриманих профілів прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості МК можемо зробити висновок, що оптимальними значеннями для приросту МК є концентрація цукрів 30 г/л, а пептону та дріжджового екстракту 20 г/л (рис. 3).



Джерело: побудовано авторами.

Рис. 1. Вплив факторів оптимізації на продукцію МК у *Lactobacillus plantarum*

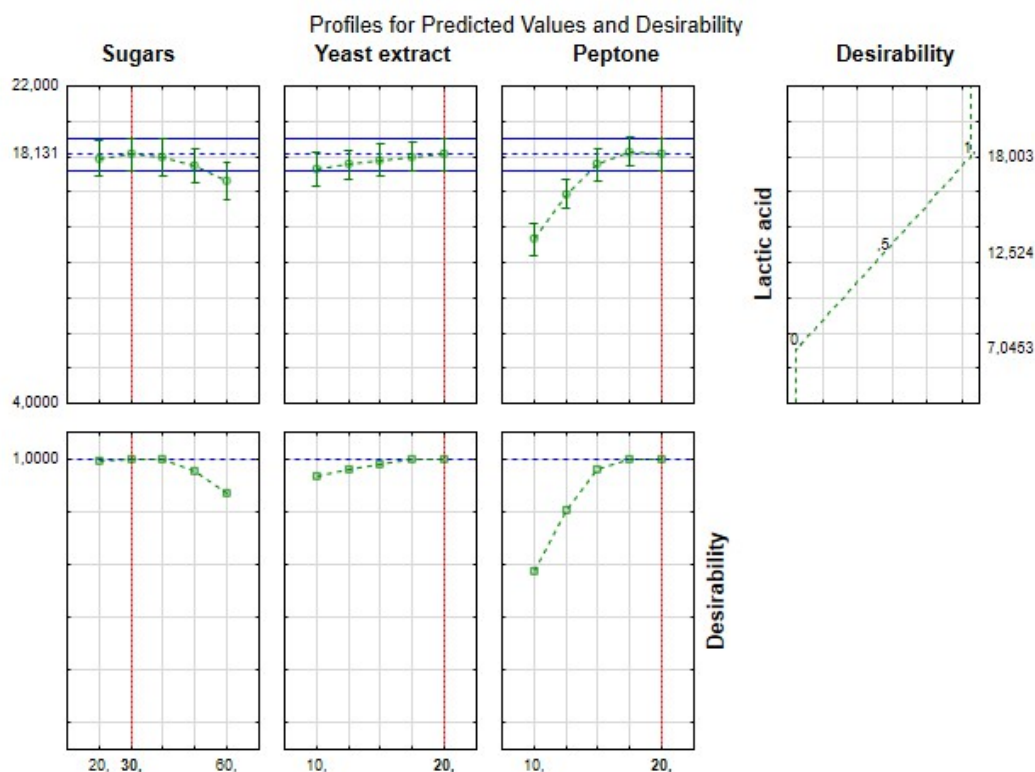


Джерело: побудовано авторами.

Рис. 2. Поверхня відгуку приросту МК від досліджуваних факторів
(концентрація цукрів та пептон)

Оцінюючи профілі прогнозованих значень (рис. 3), були визначені оптимальні умови для максимального виходу МК за яких максимальна концентрація досягала 18,003 г/л.

Висновки. При використанні повнофакторного дизайну дослідження статистично значущими факторами ефективності утворення МК були концентрація пептону та концентрація цукрів в поживному середовищі і лінійна взаємодія цих двох факторів.



Джерело: побудовано авторами.

Рис. 3. Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості МК

Величина найбільшого виходу МК становила 18,003 г/л, при оптимальних показниках: концентрація пептону – 20 г/л; концентрація дріжджового екстракту – 20 г/л і концентрація цукрів 30 г/л.

Список використаної літератури

1. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013. Vol. 31, No. 6. P. 877–902.
2. Hammes W. P., Hertel C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*. New York, NY, 2006. P. 320–403.
3. Teuber M. Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology*. Weinheim, Germany, 2008. P. 325–366.
4. Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. Vol. 26, no. 2-4. P. 87–107.
5. Ricciardi, A. et al. (2015). Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 119, No. 3, P. 776–785.
6. Lazic, Z. R. (2005). *Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide*. Wiley-VCH. P. 350–360.
7. Panesar, P. S. et al. (2007). Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for l(+) lactic acid production from whey. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 74, No. 1, P. 35–42.
8. Wegkamp, A. et al. (2010). Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 50, No. 1, P. 57–64.
9. Coelho, L. F., et al. (2011). Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, No. 28, P. 27–36.