

УДК 579.663

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА-МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ LACTOCOCCUS LACTIS CH5

Илушка Игорь Валериевич
соискатель

Доценко Сергей Павлович
д.х.н., профессор
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Боровский Анатолий Борисович
к.т.н., доцент
Кубанский социально-экономический институт, Краснодар, Россия

Арутюнян Маргарина Мкртычевна
к.х.н., доцент
Краснодарское военно-воздушное авиационное училище летчиков, Краснодар, Россия

Получены соотношения для оценки устойчивости стационарных состояний процесса микробиологического синтеза молочной кислоты. В основу положены кинетические зависимости для удельной скорости роста биомассы, расходования субстрата и получения продукта. Получены зависимости скорости роста культуры, увеличения ее биомассы и продуктивности молочнокислого микроорганизма *Lactococcus lactis* CH5 и определены оптимальные условия биосинтеза молочной кислоты

Ключевые слова: ЛАКТОКОККИ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, БИОСИНТЕЗ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

UDC 579.663

MODELING OF CULTIVATION ON PRODUCTIVITY LACTIC ACID PRODUCER LACTOCOCCUS LACTIS CH5

Ilushka Igor Valeryevich
postgraduate student

Dotsenko Sergey Pavlovich
Dr.Sci.Chem., professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Borovsky Anatoliy Borisovich
Cand.Tech.Sci., associate professor
Kuban socio-economic institute, Krasnodar, Russia

Arutyunyan Margarita Mkrtychevna
Cand.Chem.Sci., assistant professor
Krasnodar air force military college for pilots, Krasnodar, Russia

The equations for evaluation of the stationary state of lactic acid microbiological synthesis have been received. The kinetic dependencies for specific biomass growth rate, consumption of the substrate are given. The particular qualities of growth of homofermentative lactic acid producer *Lactococcus lactis* CH5 depending on the composition nutrient medium: glucose and yeast autolysate concentration are examined. The influence of the method of cultivation on the productivity and the speed of the lactic acid synthesis are analyzed

Keywords: LACTOCOCCUS LACTIS, MICROORGANISMS, PRODUCTION OF LACTIS ACID

Молочная кислота широко используется в пищевой промышленности для производства напитков, мармелада, в процессах консервирования [1]. Также ее применяют в кормопроизводстве и в тяжелой промышленности. Молочная кислота хорошо полимеризуется. Спрос на нее вырос в связи с возможностью ее использования в качестве исходного сырья для биоразлагаемых полимеров, оксигенированных веществ, регуляторов роста

растений и химических продуктов специального назначения [2]. Микробиологический синтез молочной кислоты гораздо рентабельнее химического [3,4.5]. Продуценты молочной кислоты гомоферментативные молочнокислые бактерии используют в составе пробиотиков для лечения людей и молодняка животных [6].

Важным направлением работ по оптимизации производства молочной кислоты является изучение биологических свойств продуцентов молочнокислого брожения, селекция активных гомоферментативных молочнокислых бактерий, оптимизация параметров управления процессом биосинтеза. Также важным является изучение и применение оптимальных условий роста отобранных культур микроорганизмов и эффективности процесса кислотообразования. Посредством таких факторов как источники азота и углерода, рН, температура, способ культивирования можно влиять на титр культуры- продуцента молочной кислоты и ее продуктивность [8].

Повысить выход молочной кислоты можно с помощью стрессовых факторов, которые мы будем называть «критическими условиями», таких как повышенная температура, высокие или низкие значения рН, высокие концентрации исходных реагентов, высокие концентрации клеток, введение различных химических компонентов не участвующих в метаболических путях молочнокислого брожения, таких как этанол и т.д., введение в систему различных бактериостатиков WO2009006909A1.

Математическое моделирование любого биотехнологического процесса, аппарата или системы сводится к оценке скорости протекания биохимических процессов, которая определяется скоростью биохимической деятельности (роста) микрообъектов в зависимости от одного или нескольких параметров среды, обеспечивающей протекание метаболических процессов. В ходе процесса имеет место закономерное изменение кинетических характеристик роста, биосинтеза продукта метаболизма, потребления субстрата. Все эти изменения подчиняются некоторым кинетическим зависимостям, которые являются по существу основой теории процесса культивирования микроорганизмов и биосинтеза продуктов метаболизма и являются объектами исследования кинетики биотехнологических процессов [1].

Кинетика биотехнологических процессов изучает закономерности изменения скорости роста микроорганизмов и биосинтеза продуктов метаболизма в зависимости от текущих концентраций субстратов, биомассы, продуктов метаболизма, температуры и pH среды [2].

Нам проанализированы модели процессов биосинтеза, в том числе и использованные для моделирования процессов ферментативного синтеза молочной кислоты [3-8]. Особого внимания заслуживают модели, учитывающие так называемые стресс- факторы в зоне ферментации, т.е. локальные поля температур, концентраций субстратов и pH [4].

В работе были использованы штаммы молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* CH5, *Lactobacillus helveticus* B-4040, *Lactobacillus delbrueckii* Л 20, полученные из коллекции ВКПМ и выделенные из кисломолочных продуктов Северо-Кавказского региона. Для культивирования молочнокислых микроорганизмов была использована среда MRS [9]. Источником углерода в среде была глюкоза, источником азота – дрожжевой экстракт.

Используем следующие условные обозначения:

X - концентрация биомассы (g/l);

S - концентрация субстрата (g/l);

S_0 - начальная концентрация субстрата (g/l);

P - концентрация молочной кислоты (g/l);

Q_1 - объёмный уровень концентрата (l/h);

Q_2 - объёмный уровень фильтрата (l/h);

V - объём реактора (l);

R_x, r_s, r_p – уровень продуктивности или потребления биомассы, субстрата и продукта (g/l.h);

$Y_{x/s}, Y_{p/s}$ – коэффициент выхода целевого продукта по отношению к исходному (g/g);

m – коэффициент обратный от времени (h⁻¹);

μ – удельная скорость прироста биомассы клеток (h⁻¹);

μ_{max} – максимальная скорость прироста биомассы клеток (h⁻¹);

K_d – коэффициент гибели клеток (h⁻¹);

K_s, K_{is}, K_{ip} – кинетические коэффициенты (g/l);

n - коэффициент ингибирования (безразмерный)

Система уравнений для описания основных процессов биосинтеза представлена в виде:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= r_x'' - \frac{Q_1 X}{V} & \frac{dS}{dt} &= \frac{Q_1 + Q_2}{V} (S_0 - S) - r_s'' \\ \frac{dP}{dt} &= r_p'' - \frac{Q_1 + Q_2}{V} P \\ \mu &= \frac{\mu_{max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_{is}}} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^n} - K_d \\ r_x'' &= \mu X & r_s'' &= \frac{1}{Y_{x/s}} r_x'' + mX & r_p'' &= Y_{p/s} r_x'' \end{aligned}$$

В процессе оптимизации параметров получили следующие данные: $\mu_{max}=0,46 \text{ h}^{-1}$; $K_s=0,12 \text{ g/l}$; $K_{is}=904 \text{ g/l}$; $K_{ip}=65 \text{ g/l}$; $n=3,83$; $m=0,14 \text{ h}^{-1}$; $K_d=0,12 \text{ h}^{-1}$; $Y_{x/s}=0,17 \text{ g/g}$; $Y_{p/s}=0,89 \text{ g/g}$.

Параметры оптимизировались с помощью программы: Matlab 5.0 software environment.

Результаты показаны на рисунке ниже:

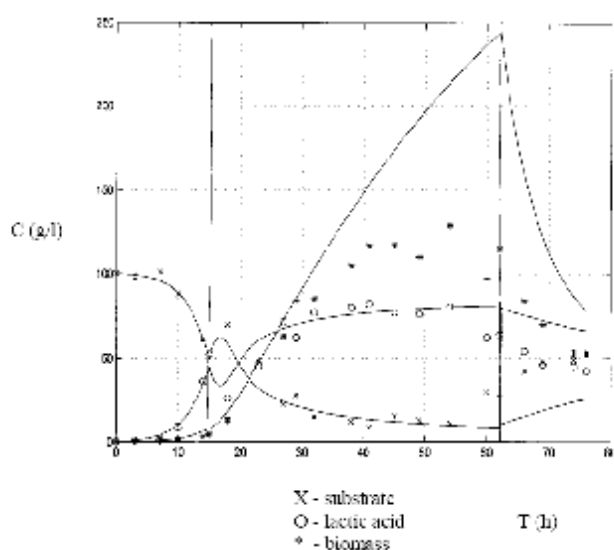


Рисунок 1 – Кинетика процесса биосинтеза молочной кислоты в соответствии с моделью (1)

Следующий шаг – это введение стрессового фактора. β – стрессовый коэффициент (l/g.h).

Математическая модель ферментационного процесса в зоне стресса будет описываться следующими уравнениями:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= r_x''' - \frac{Q_1 X}{V} - \beta X^2 \\ \frac{dS}{dt} &= \frac{Q_1 + Q_2}{V} (S_0 - S) - r_s''' & \frac{dP}{dt} &= r_p''' - \frac{Q_1 + Q_2}{V} P \\ \mu &= \frac{\mu_{max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_{is}}} \frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^n} - K_d \\ r_x''' &= \mu X & r_p''' &= Y_{p/s} r_s''' & r_s''' &= \frac{l}{Y_{x/s}} r_x''' + mX \\ \frac{dK_d}{dt} &= A_1 K_d & \frac{dY_{p/s}}{dt} &= -A_2 Y_{p/s} & \frac{d\beta}{dt} &= A_3 \beta \end{aligned} \quad (2)$$

Где A_1, A_2, A_3 – стрессовые коэффициенты.

$$\begin{aligned} \pi_{max} &= \frac{r_p}{X} = Y_{p/s} \frac{r_s'''}{X} \\ \pi_{max} &= -1 * 10^{-7} * Z^2 + 2 * 10^{-6} * Z + 2 \end{aligned} \quad (3)$$

Z- производительность рециркуляционного насоса в мембранном биореакторе. Результаты моделирования с учетом стрессового фактора представлены на рисунках (2) и (3).

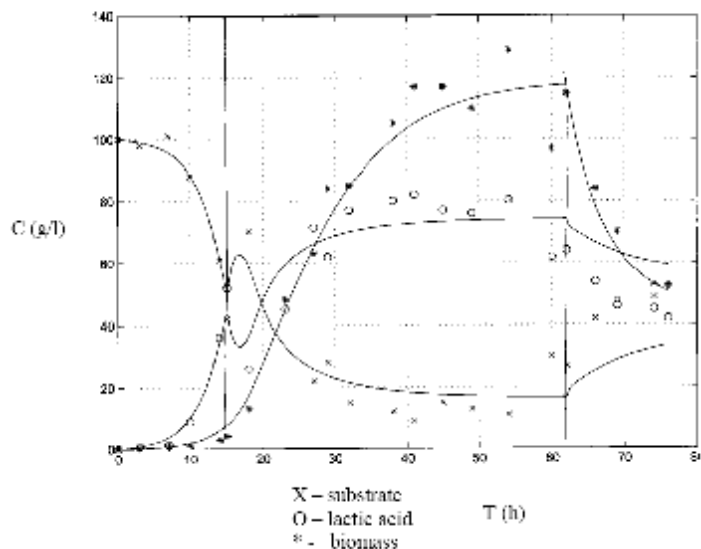


Рисунок 2 – Кинетика процесса биосинтеза молочной кислоты в соответствии с моделью (2) без учета рециркуляции

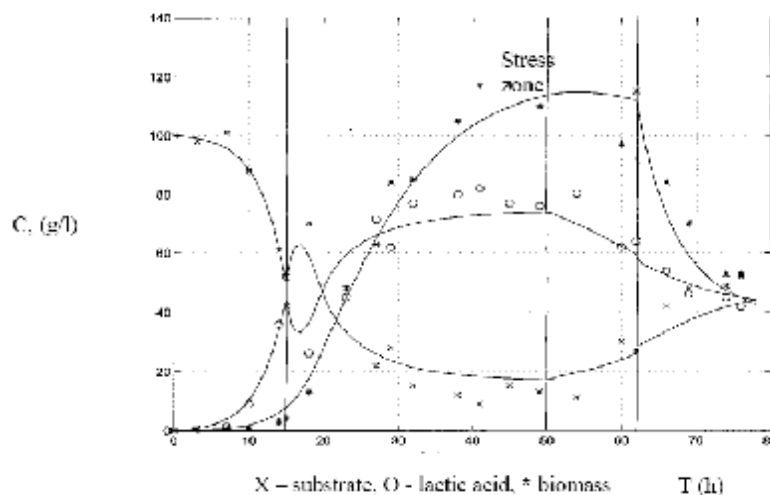


Рисунок 3 – Кинетика процесса биосинтеза молочной кислоты в соответствии с моделью (2) с учетом рециркуляции

Сравнивая результаты моделирования, можно сделать вывод, что стрессовая модель с учетом рециркуляции лучше описывает экспериментальные данные в в зоне оптимального ведения процесса.

Обобщая полученные нами результаты, можно сказать, что культура *L.lactis* CH5 является перспективным продуцентом молочной кислоты. Она имеет значительную толерантность к низким рН, обладает высокой скоростью роста и продуктивностью. Наилучшие показатели скорости роста биомассы и синтеза молочной кислоты были получены на среде MRS с добавлением 50 г/л глюкозы и 20 г/л дрожжевого автолизата.

Для моделирования и оптимизации процесса биосинтеза молочной кислоты в мембранном ферментере по результатам сравнения расчетных и экспериментальных данных рекомендуется модель, учитывающая стрессовые факторы процесса биосинтеза. Эта модель может быть распространена на непрерывные многостадийные процессы. В дальнейшем для моделирования функционирования многосупенчатых ферментационных установок необходимо ввести в модель соотношения, характеризующие влияния биомембранного элемента в конструкции реактора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кафаров В. В. Моделирование биохимических реакторов / В. В. Кафаров, А. Ю. Винаров, Л. С. Гордеев – М.: Лесная промышленность, 1979- 344с..
2. Дворецкий Д.С. Компьютерное моделирование биотехнологических процессов и систем: Учеб. пособие / Д.С. Дворецкий, С.И. Дворецкий, Е.И. Муратова, А.А. Ермаков. Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2005. 80 с.
3. Скороходов А.В. Моделирование процессов ферментации в мембранных биореакторах: Автореф. дис. на соиск. уч. степ канд. техн. наук. Рос. хим.-технол. ун-т, Москва, 2002, 16 с.
4. Duwat P., Cesselin B., Souris S.,Gruss A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival//J.Food Microbiol.2000.Vol.55.P.83-86.
5. Sjoberg A.,Persson I.,Quednau M.,Hahn-Hagerdal B. The influence of limited and non-limited growth conditions on glucose and maltose metabolism in *Lactococcus lactis* ssp.*lactis* strains//Appl.Microbiol.fnd Biotechnol. 1995. Vol.42 .№6 P.931-938.

6. Гордеева Ю. Л. Моделирование периодического процесса микробиологического синтеза с нелинейной кинетикой роста микроорганизмов / Ю. Л. Гордеева, Ю. А. Ивашкин, Л. С. Гордеев // Вестник АГТУ, Сер. Управление, выч. техника и информатика, 2011, №1, с. 37-43
7. Гордеева Ю. Л. Устойчивость стационарных состояний процесса биотехнологического получения молочной кислоты / Ю. Л. Гордеева, Ю. А. Ивашкин, Л. С. Гордеев // Вестник АГТУ, Сер. Управление, выч. техника и информатика, 2012, №2, с. 27-33
8. Nandasana A. D., Kumar S. Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKYJ // Biochem. Eng. Journal. – 2008. – N 38. – P. 277–284..
9. Миневич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. М., 2005. 353 с.