

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КРАХМАЛИСТОГО СЫРЬЯ

М. М. ШАМЦЯН, В. И. ЯКОВЛЕВ, К. МИЗОКАМИ,  
Т. ЯМАМОТО, Э. Г. АФРИКЯН,

Институт микробиологии ИАН Армении, Ереван  
Санкт-Петербургский технологический институт, Россия  
Университет Фукуока, Япония

Изучена возможность микробиологического получения лактата из сырьевых материалов, содержащих крахмал — промышленных отходов производства японского саке — с использованием штамма *Streptococcus bovis* 1001.

Установлены оптимальные условия ферментации для биосинтеза молочной кислоты, температура, состав и pH ферментационной среды. Эффективность ферментации значительно стимулировалась применением глюкоамилазы.

Հնարգործվել է սույն սյուրտինակ-ը օգտագործելով կենսական ակտիվ արտադրության թափանցիկից կաշվածի լակտատի օրնացման *Streptococcus bovis* շտամի կիրառմամբ:

Սրբաղել են կաշվածի կենսաօրինակի սյուրտալ դրոշմանն ուր Քլուկոս-ճիլազի օգտագործումը նշանակալիորեն խթանել է ֆերմենտացիայի արդյունավետությունը:

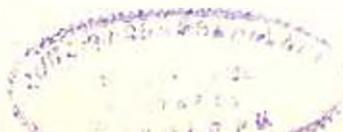
Fermentative production of calcium lactate from rice starch, a waste product of polishing of rice grain for making traditional Japanese Sake and using *Streptococcus bovis* strain has been studied.

Lactate was effectively produced directly from undocked starch.

Addition of the glucoamylase has essentially stimulated fermentation and production of lactic acid.

Биосинтез молочной кислоты — лактат — крахмалистое сырье

Производство молочной кислоты является одним из наиболее важных микробиологических процессов, которому посвящено множество публикаций. В последние годы производство молочной кислоты вызывает особый интерес в связи с новыми возможными применениями ее. Кроме использования в качестве сырья и добавок в медицинской и пищевой промышленности, лактат имеет новые потенциальные возможности применения, в частности, при получении биodeградируемых пластиков, приготовленных на основе полилактата. Наряду с разработкой более экономичных ферментативных процессов, это может значительно расширить рынок молочной кислоты [6, 7, 9, 10].



Микробиологический метод получения молочной кислоты является наиболее предпочтительным.

Согласно данным ряда авторов, биосинтез молочной кислоты ингибируется накоплением продукта, чем ограничивается его дальнейшее производство [5, 10]. Из многочисленных источников известно также, что нелизоцинированная форма молочной кислоты является основным агентом, ограничивающим бактериальный рост [1, 2]. Для преодоления этого недостатка нами был использован карбонат кальция с получением лактата кальция и качестве конечного продукта.

Сахарификация сырого крахмала также является лимитирующим фактором при ферментативном производстве лактата [3, 4, 11]. Для решения этой проблемы сахарификацию крахмала осуществляли с применением глюкоамилазы, позволяющей гидролизовать несваренный крахмал.

В настоящей работе описано ферментативное производство лактата кальция из сырого рисового крахмала с использованием штамма *Str. bovis*. Особое внимание уделено условиям ферментации, методу стерилизации сырого крахмала, эффекту добавления глюкоамилазы для ускорения сахарификации крахмала, а также методу выделения и очистки конечного продукта.

**Материал и методика.** Для получения лактата кальция использовали рисовые отруби, являющиеся отходами производства японского сака.

Для производства японского сака рисовое зерно подвергается многоступенчатой обработке, в ходе которой последовательно отсребываются его поверхностные слои, содержащие значительное количество белков и витаминов. Лишь внутренняя часть зерна, состоящая в основном из крахмала и составляющая примерно 60—70% его изначальной массы, используется для производства сака. Отходы, получаемые на первой стадии полировки зерна, имеют рыже-коричневый цвет и содержат наибольшее количество некрахмалистых продуктов, они называются «аханука—красные отруби». Отходы последующей стадии полировки («широнюка» (белые отруби), —получаются из относительно внутренних слоев рисового зерна. Эти отруби и были использованы нами в качестве порошка рисового крахмала. Содержание крахмала в белых рисовых отрубях, полученных из фирмы «Миязаки Хонтен» (г. Покканчи, префектура Миэ, Япония), было определено методом фенол-серной кислоты и составляло примерно 75%.

В экспериментах использовали реактивы фирмы «Вако» (Япония), если не отмечено иначе.

Использован штамм *Streptococcus bovis* № 148, выделенный из желудка теленка и являющийся гомоферментативным продуцентом L (+) молочной кислоты. Эта культура способна также расщеплять сырой клеточный крахмал в глюкозу и мальтозу, согласно Мизоками с соавт. [8]. Инокулят выращивали культивированием бактерий в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, содержащих по 400 мл среды, состоящей из (%): глюкозы—2,0, дрожжевого экстракта («Дифко», США)—0,5, полипептона («Дифко», США)—0,5 (рН среды—6,0—6,5). После суточного выращивания инокулят добавляли в ферментационной среде в количестве 5% с конечной концентрацией около  $10^7$  клеток бактерий на 1 мл.

Микроорганизмы также выращивали в ферментаторе (10 л), содержащем 8 л ферментационной среды, при постоянной температуре, с постоянным или периодическим перемешиванием, а также без него. Осуществляли постоянную, только начальную подачу углекислоты или исключали ее.

В экспериментах использовали и 300 л ферментаторы с содержанием ферментационной среды 240 л. Все ферментационные среды готовили, используя в качестве крахмала белые рисовые отруби, которые для стерилизации предварительно погружали в несколько объемов 0,02 N серной кислоты на несколько часов при комнатной температуре. Непосредственно перед добавлением инокулята для нейтрализации кислоты к раствору крахмала добавляли карбонат кальция. Рисовый крахмал подвергнутой кислотной обработке и нейтрализованный карбонатом кальция, использовали в экспериментах в качестве «среды на рисовом крахмале». Количество карбоната кальция, добавленного к среде, составляло 45 г на 100 г белых отрубей. В последующем карбонат кальция был заменен перемолотой яичной скорлупой — отходами яичноперерабатывающих производства фирмы «Тайо Кагаку» в г. Покканчи. Содержание карбоната кальция в яичной скорлупе составляло более 98%.

Использовали препарат глюкоамилазы из *Rhizopus delemar*, вырабатываемый фирмой «Шин Нихон Кэинкал» под названием «Сумизейм 2000». Этот фермент обычно добавляли в соотношении 0,05% к содержанию крахмала в ферментационной среде.

Заданную температуру в ферментаторах поддерживали с помощью циркуляции воды с контролируемой температурой.

Рост клеток во время ферментации определяли путем подсчета живых колоний, содержание общего сахара — методом фенол-серной кислоты и выражали как глюкозный эквивалент, наличие крахмала в среде — цветной реакцией с йодом, содержание молочной кислоты — методом ВЭЖХ, применяя жидкостной хромат. граф «Eysela» PLC-5P, оснащенный колонкой «Бириад» для анализа органических кислот.

Результаты и обсуждение. Оптимальную температуру роста клеток *Str. bovis* и производства молочной кислоты определяли в экспериментах, проведенных при начальном значении pH среды 6,5. Выявлено, что как для роста продуцента, так и для накопления конечного продукта ферментации — лактата оптимальными являются значения температур в пределах от 37 до 40°C (табл. 4).

Таблица 4. Влияние температуры на рост клеток *Str. bovis* и биосинтез молочной кислоты (среда с содержанием раствора крахмала 8%, начальное значение pH — 6,5, продолжительность ферментации — 30 ч)

Температура, °C	Клеточный титр, млрд клеток/мл	Концентрация лактата, г/л
32	5,4	25,3
35	7,0	31,1
37	7,8	34,7
40	7,6	36,5
42	6,7	32,4
45	4,9	23,5

Оптимальное значение pH при 40°C варьировало в пределах 6,2 и 6,7 (табл. 2).

Данные серии экспериментов по изучению влияния различных условий ферментации и добавок к ферментационной среде на образование лактата кальция обобщены в табл. 3 и 4. Как видно, наилучшие результаты достигаются при перемешивании ферментационной среды в анаэробных условиях с добавлением глюкоамилазы, в то время как в

аэробных условиях в результате окислительного фосфорилирования происходит синтез и других органических кислот (табл. 3).

Таблица 2. Влияние начального значения pH на рост *Str. bovis* и биосинтез молочной кислоты (среды с содержанием 4% рисового крахмала, продолжительность ферментации — 30 ч при 40°С)

Значение pH		Конечный титр клеток $\text{мл} \times 10^6$	Концентрация лактата, г/л
начальное	конечное		
5.0	4.0	4.2	18
5.5	4.0	5.3	25
6.0	4.2	6.9	31
6.2	4.3	7.3	35
6.3	4.3	7.7	37
6.5	4.4	7.8	36
6.7	4.5	7.5	35
7.0	5.7	6.4	28
7.2	6.3	6.0	25
7.5	6.8	5.1	21

Таблица 3. Влияние условий ферментации на биосинтез молочной кислоты (содержание рисового крахмала в среде — 10%, начальное значение pH 6.7, продолжительность ферментации 60 ч при 37°С)

Условия ферментации	Концентрация лактата, г/л	Наличие других органических кислот
Без перемешивания Без подачи $\text{CO}_2$ Без добавления глюкоамилазы	52	большое количество
С перемешиванием Без подачи $\text{CO}_2$ Без добавления глюкоамилазы	41	большое количество
С перемешиванием С начальным насыщением $\text{CO}_2$ Без добавления глюкоамилазы	81	не обнаружено
С перемешиванием С постоянной подачей $\text{CO}_2$ Без добавления глюкоамилазы	83	не обнаружено
С перемешиванием С начальным насыщением $\text{CO}_2$ С добавлением глюкоамилазы	90	не обнаружено

Влияние различных добавок на скорость ферментации иллюстрируют данные, приведенные в табл. 4. Добавление глюкоамилазы к ферментационной среде (0.05% к содержанию крахмала в среде) привело к значительному ускорению процесса. Однако, дальнейшее увеличение ее концентрации не способствовало еще большему ускорению ферментации. На скорость биосинтеза молочной кислоты положительно влияет также добавление молочной сыворотки, дрожжевого экстракта и картофельного отвара, но не столь эффективно, как наличие глюкоамилазы (табл. 4).

Таблица 4. Влияние концентрации различных добавок на продолжительность ферментации молочной кислоты (температура — 37°С, начальное значение рН 6,5)

Концентрация белых рисовых отрубей, %	Продолжительность ферментации до ее полного завершения (часы) при различных добавках				
	без добавок	глюкоамилаза*	глюкоамилаза и молочная сыворотка**	дрожжевой экстракт и картофельный отвар***	глюкоамилаза, дрожжи и экстракт и картофельный отвар
12	140	85	75	118	80
8	70	42	42	62	41

\* Количество добавленной глюкоамилазы 0,035 г на 100 г белых рисовых отрубей.

\*\* Молочная сыворотка добавлялась в соотношении 10 мл к 100 мл раствора.

\*\*\* Дрожжевой экстракт и картофельный отвар добавлялись в соотношении 10 мл к 100 мл раствора.

Одним из важнейших критериев эффективности производства молочной кислоты данным способом являлась концентрация субстрата. В табл. 5 показано влияние концентрации рисового крахмала на скорость и эффективность ферментации.

Таблица 5. Влияние концентрации рисового крахмала на скорость и эффективность ферментации (температура 40°С, начальное значение рН 6,5, постоянное перемешивание и подача С<sub>0</sub>)

Концентрация рисового крахмала, г/л	Получены продукты, г/л	Продолжительность ферментации, ч	Эффективность ферментации, г/л час
100	99	60	1,65
120	112	81	1,38
140	122	88	1,39
160	139	106	1,31

Из данных таблицы следует, что продолжительность ферментации до ее полного завершения при концентрации рисового крахмала в среде 10% составляла 60 часов. Эффективность процесса также была тем выше, чем ниже была концентрация субстрата. Однако, учитывая энергетические затраты при выпарке большого количества воды для выделения лактата кальция, ферментации с более высоким содержанием субстрата могут быть экономически более эффективными.

Во всех ферментациях для снятия ингибирующего влияния накапливающейся молочной кислоты на рост клеток продуцента (что в свою очередь приводит к снижению продуктивности процесса) к ферментационной среде добавляли карбонат кальция в соотношении 45 г на 100 г белых рисовых отрубей. Это было эффективно не только в отношении нейтрализации образовавшейся молочной кислоты, но и выделения углекислого газа в ходе образования лактата кальция. В ряде ферментаций кар-

Сонат кальция был успешно заменен перемолотой яичной скорлупой, что никак не снижало скорости ферментации и повышало экономическую эффективность процесса.

Лактат, полученный при 40°C в течение 60 ч в 300 л ферментаторе (28 кг белых рисовых отрубей при объеме заполнения 240 л, постоянном перемешивании и подаче CO<sub>2</sub>, с добавлением 14 г глюкоамилазы) был выделен и очищен. Культуральную среду подщелачивали CaOH до pH 9,4 и нагревали до 80° в течение 30 минут. Раствор нейтрализовывали молочной кислотой до pH 6,5, сепарировали, обесцвечивали активированным углем (0,2% 70°C), затем фильтровали с целитом через пресс-фильтр. Обесцвеченный фильтрат высушивали в распылительной сушилке или концентрировали до содержания РВ выше 30% и оставляли на холоду для осаждения. Образовавшийся в результате сушки порошок или кристаллическую массу промывали холодной водой или этанолом и перекристаллизовывали на холоду. Рекристаллизованный лактат кальция высушивали в воздушном потоке при 40°C до постоянного веса. Хроматографические анализы очищенного лактата кальция давали идентичный со стандартными образцами результат, и чистота очищенного препарата была более 98%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов В. А. Пищевые кислоты. М., 1983.
2. Balpai R. K., Janett B. I. In Handbook of anaerobic fermentation (Ed. L. E. Ericson and D. Y. C. Fung), Marcel Dekker, Inc. New York, 207-241, 1988.
3. Handbook of amylases and related enzymes. (Ed. T. Yamamoto), 195-226 Pergamon Press, Oxford, 1988.
4. Hoshino K., Taniguchi M., Marumoto H., Fujii M. Agric. Biol. Chem. (Japan), 1961-1966, 19-1.
5. J. G. Ishizaki A., Ohta T. J. Ferment. Bioproc., 67, 46-51, 1989.
6. Jain M. K., Datta R., Zeikus J. G. In: Bioprocess engineering (Ed. Chose T. K.), 366-379 E. Horwood, Litchester, 1989.
7. L. plinsky E. S., Stacler K. G. Chem. Eng. Progr., 8, 26-32, 1986.
8. Mizokami R., Kozaki M., Kitahara K. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 51, 299-307, 1977.
9. Naud A. Chem. Marketing Reporter, 26, 5-7, 1989.
10. Ohara H., Hiyama K., Yoshida T. Appl. Microbiol. Biotechnol., 6, 773-776, 1982.
11. Tamao S., Sasaki H., Kurosawa K., Tanida M., Kawagata Y. Agric. Biol. Chem., 56, 1978-1984, 1987.

Получено 11.11.1991 г.