

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 577

### **МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ШТАММОМ *BACILLUS COAGULANS B-10468***

© М.А. Еськова, Я.В. Устинская

*Аннотация.* Проведены исследования влияния фильтрата, полученного после культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2 и режима аэрации, на процесс биосинтеза молочной кислоты, а также создана математическая модель процесса. Установлено стимулирующее влияние фильтрата на накопление молочной кислоты и аэрации на прирост бактериальной биомассы.

*Ключевые слова:* молочная кислота; *Chlorella vulgaris*; моделирование

Молочная кислота является продуктом с быстрорастущим рынком потребления, который оценивается в 130–150 тыс. тонн в год [1]. Молочная кислота находит применение в пищевой промышленности, медицине и фармакологии, сельском хозяйстве, химических производствах [2].

Способность молочной кислоты к полимеризации активно используется для производства биоразлагаемых полимеров. Организация производства биоразлагаемых пластиковых материалов из лактата позволяет решить важные экологические вопросы и обеспечить снижение экологической нагрузки на полигоны захоронения твердых бытовых отходов.

Известно, что выпуск биополимеров на территории России в настоящее время практически не осуществляется, несмотря на их востребованность. Основным препятствием является их стоимость, в 3–5 раз превышающая стоимость синтетических пластиков. Повысить конкурентоспособность биопластиков можно путем создания оптимальных условий, определяющих максимальный выход молочной кислоты, что можно сделать, используя методы математического моделирования.

Целью исследования является изучение биосинтеза молочной кислоты и создание математической модели процесса биосинтеза молочной кислоты.

## МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Определение ионов аммония осуществлялось в соответствии с ГОСТ 33045-2014<sup>1</sup>; фосфат-анионов – ГОСТ 18309-2014<sup>2</sup>. Подсчет общего числа клеток в 1 мл суспензии выполнен под микроскопом с использованием счетной камеры Горяева.

Количество глюкозы и молочной кислоты определяли с помощью анализатора глюкозы и лактата Biosen C-line GP+ (ошибка измерений = 1,5 %). Активную кислотность (рН) определяли с использованием рН-метра Анион 4110 (ошибка измерений = 2 %).

На первом этапе исследований осуществляли культивирование микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2 на среде Тамия ОРТИМУМ с постоянной подачей газовой смеси.

Эксперимент проводился при следующих фиксированных условиях:

- 1) объем посевного материала – 10 % от объема питательной среды;
- 2) фотопериод составлял 24 часа;
- 3) расход газо-воздушной смеси для барботажа суспензии – 80 л/ч;
- 4) температура культивирования микроводоросли – 30 °С.

Использовались два образца, которые выращивались при разной степени освещенности (№ 1 – 5 кЛк; № 2 – 25 кЛк), характеристика которых приведена в табл. 1.

Таблица 1

### Характеристика образцов

| № образца | Начальное содержание ионов аммония | Начальное содержание фосфатов | рН   |
|-----------|------------------------------------|-------------------------------|------|
| 1         | 12,04                              | 120,18                        | 9,6  |
| 2         | 12,6                               | 113,29                        | 9,38 |

На 8 сутки отобранную культуральную жидкость подвергали центрифугированию, и полученный фильтрат использовали для культивирования молочнокислых бактерий (второй этап).

В качестве продуцента молочной кислоты использовали штамм *Bacillus coagulans* B-10468. В качестве источника редуцирующих веществ

<sup>1</sup> ГОСТ 33045-2014. Вода. Методы определения азотсодержащих веществ. М.: Стандартинформ, 2015.

<sup>2</sup> ГОСТ 18309-2014. Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ (с поправкой). М.: Стандартинформ, 2015.

использовали свекловичную мелассу; в качестве источника стимулирующих веществ и азота – фильтрат, полученный после культивирования микроводоросли *C. vulgaris IPPAS C-2* (100 и 20 % от количества мелассы).

Получение молочной кислоты осуществлялось в режиме глубинного культивирования без нейтрализации в объеме питательной среды 0,2 дм<sup>3</sup> при следующих фиксированных условиях:

- 1) объем посевного материала – 20 % (об.), титр клеток – 900 кл/мл;
- 2) активная кислотность (рН) – 6,98...7,09;
- 3) содержание редуцирующих сахаров – 5 %;
- 4) температура культивирования – 50 °С.

Культивирование бактерий в образцах питательной среды № 1 и № 3 в течение первых двух дней осуществляли с использованием аэрации. Характеристика образцов приведена в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика образцов питательной среды

| № образца | Содержание фильтрата, % (об.) | Содержание редуцирующих сахаров | Активная кислотность |
|-----------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Контроль  | 0                             | 5                               | 7,07                 |
| 1         | 100                           | 5                               | 7,09                 |
| 2         | 100                           | 5                               | 7,06                 |
| 3         | 20                            | 5                               | 6,98                 |
| 4         | 20                            | 5                               | 7,08                 |

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Культивирование микроводоросли *Chlorella vulgaris*.** По полученным данным построены графики, описывающие динамику накопления биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris IPPAS C-2* (рис. 1), потребления фосфатов (рис. 2) и ионов аммония (рис. 3), изменения рН (рис. 4).

Анализируя рис. 1–4, можно сделать вывод, что для культивирования микроводоросли предпочтительней освещение, равное 25 кЛк. Данный уровень освещения позволяет достичь большего прироста биомассы, наблюдающегося на 8 час (25,6 млн кл/мл – на 12,11 % по сравнению с освещением, равным 5 кЛк). Концентрация фосфатов и аммония в течение 8 часов снизилась на 21,1 и 88,5 % у первого образца и 17,3 и 91,42 % у второго образца.

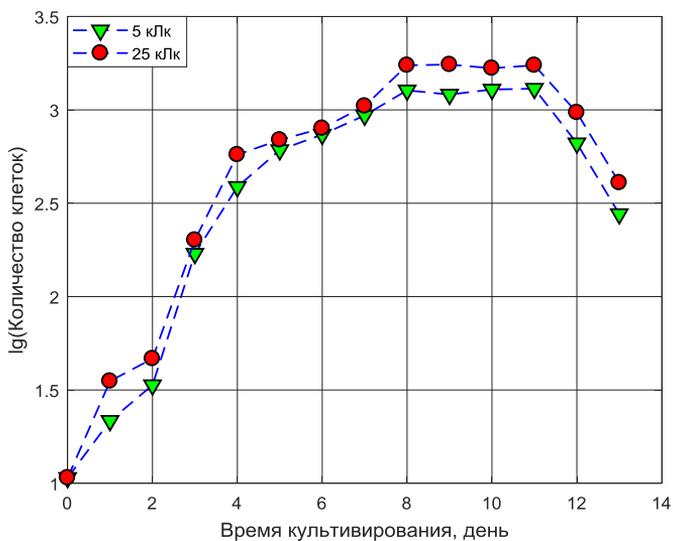


Рис. 1. Динамика накопления биомассы

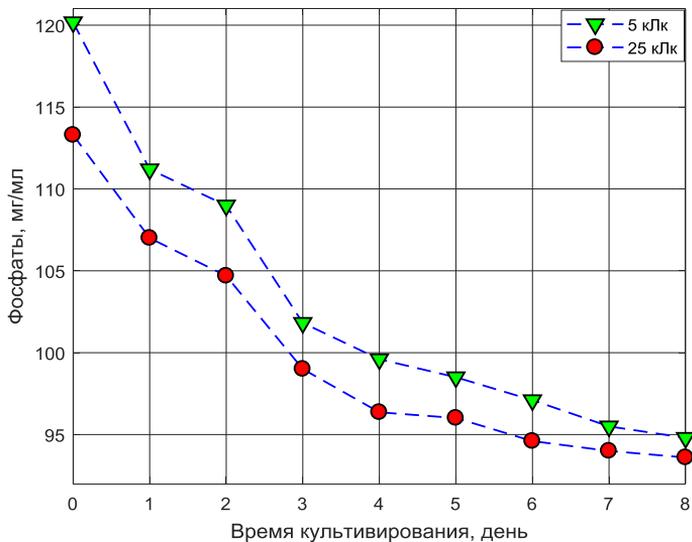


Рис. 2. Динамика потребления фосфатов

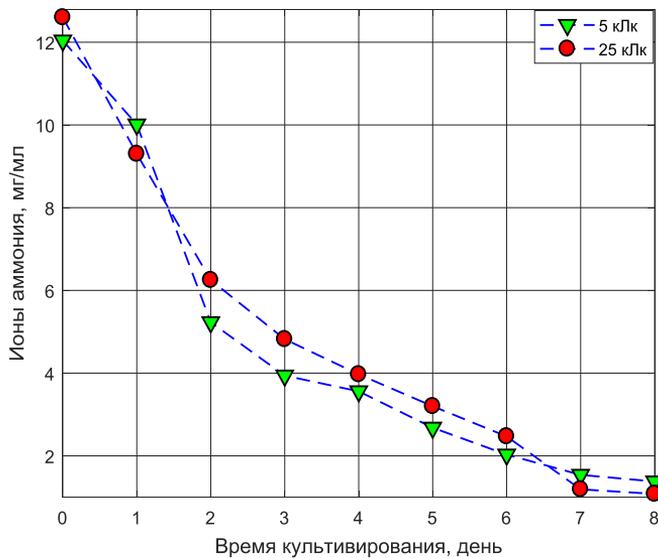


Рис. 3. Динамика потребления ионов аммония

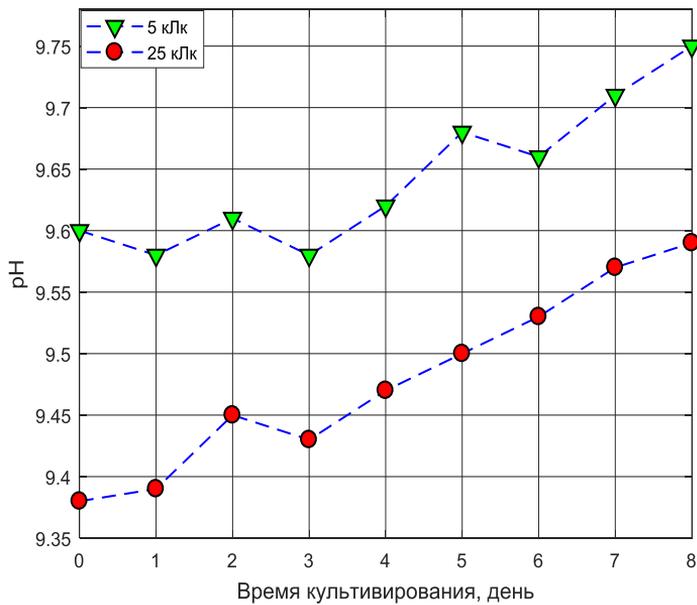


Рис. 4. Динамика изменения pH

Концентрация биогенных элементов, содержащихся в культуральной жидкости на 8 день, достаточна для культивирования бактерий *Bacillus coagulans B-10468*.

**Культивирование молочнокислых бактерий.** Фильтрат, полученный после отделения биомассы микроводорослей, и меласса использовались в качестве питательной среды для биосинтеза молочной кислоты.

По полученным данным построены графики, описывающие динамику накопления биомассы *Bacillus coagulans B-10468* (рис. 5) и молочной кислоты (рис. 6); динамику потребления глюкозы (рис. 7) и изменения рН (рис. 8).

Наибольшее количество клеток наблюдалось в аэрируемом образце питательной среды с 100 %-ным содержанием фильтрата ( $160 \cdot 10^6$  на 2 час, что больше на 88,8 %, чем в таком же образце без аэрации). Наиболее долгая экспоненциальная фаза наблюдалась в образце № 3 (20 %-ное содержание фильтрата), который также культивировался в присутствии воздуха. Данный факт можно объяснить тем, что в присутствии кислорода факультативные анаэробы *B. Coagulans* получают энергию за счет клеточного дыхания, а не брожения. На 3 сутки (у образца № 1 и № 2) и на 5 сутки (образец № 4) начинается фаза отмирания, связанная с накоплением молочной кислоты. Для предотвращения данного явления и повышения выхода молочной кислоты необходимо проводить нейтрализацию кислоты мелом.

Максимальное количество (39,2 г/л) молочной кислоты наблюдалось в образце № 2 (100 %-ное содержание фильтрата), что связано с содержанием в фильтрате витаминов группы В ( $V_1$  и  $V_2$ ), увеличивающих активность лактатдегидрогеназы. С накоплением молочной кислоты наблюдается снижение рН.

Анализируя рис. 7, можно сделать вывод, что глюкоза в образце 1 расходовалась на построение клеточного материала, так как прирост молочной кислоты незначителен.

Таким образом, несмотря на разное содержание полученной кислоты и биомассы, у всех образцов можно проследить определенную закономерность. С увеличением количества клеток увеличивается количество молочной кислоты и уменьшается количество глюкозы. Одновременно с увеличением концентрации кислоты наблюдается снижение рН. Также по мере возрастания кислотности наблюдается отмирание клеток.

**Математическое моделирование стадии биосинтеза молочной кислоты.** Накопление биомассы бактерий (рис. 5) имеет характер кривой, соответствующий логистическому уравнению Ферхюльста [3] для ограниченного роста популяции:

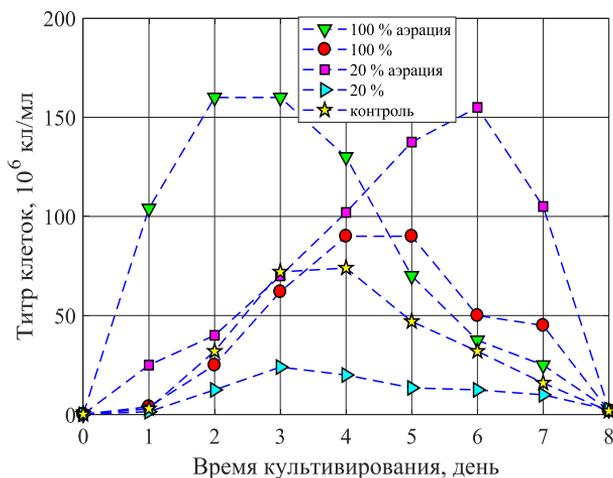


Рис. 5. Динамика изменения биомассы

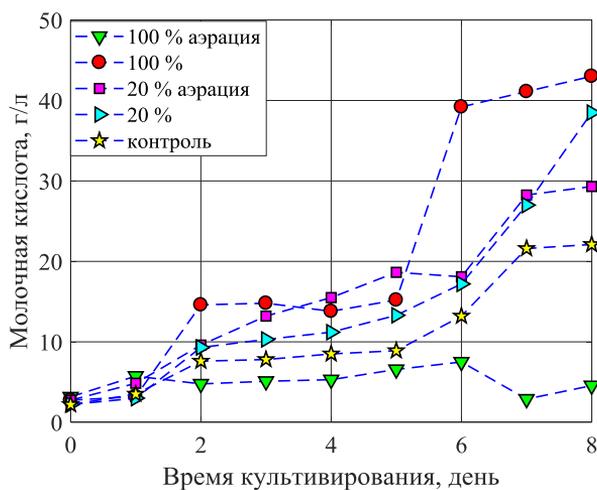


Рис. 6. Динамика накопления молочной кислоты

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \cdot \left(1 - \frac{x}{E_n}\right),$$

где  $x$  — концентрация биомассы клеток, млн кл/мл;  $\mu$  — удельная скорость роста, сут. $^{-1}$ ;  $E_n$  — емкость популяции, млн кл/мл.

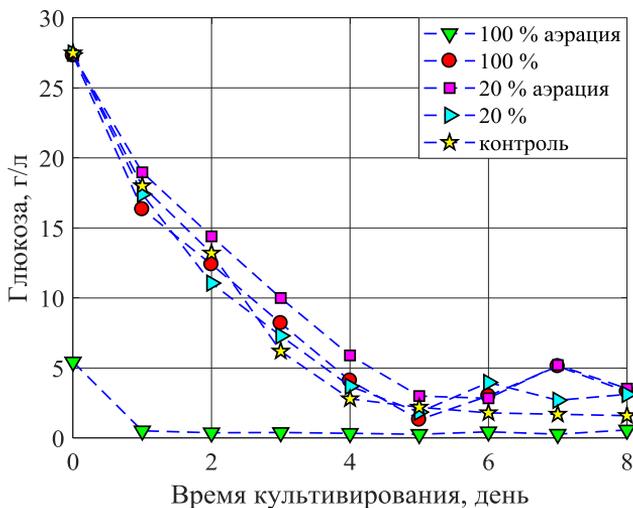


Рис. 7. Динамика потребления глюкозы

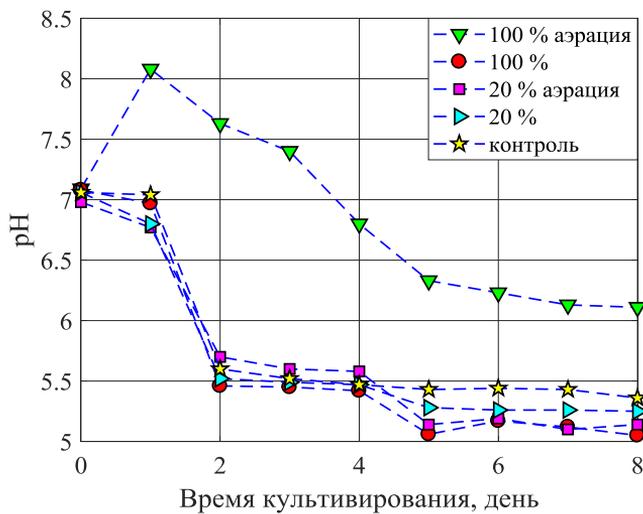


Рис. 8. Динамика изменения pH

Удельная скорость роста зависит от концентрации глюкозы и молочной кислоты и описывается уравнением Моно-Иерусалимского [4]:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot \frac{1}{1 + \frac{P}{K_P}},$$

где  $\mu_{\max}$  – максимальная удельная скорость роста (константа),  $\text{ч}^{-1}$ ;  $S$  – количество глюкозы, г/л;  $K_S$  – константа насыщения,  $K_P$  – константа ингибирования;  $P$  – количество молочной кислоты, г/л.

Процесс убыли глюкозы (рис. 7) описывается уравнением [4]:

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{XS}} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_{PS}} \frac{dP}{dt} + m_s x\right),$$

где  $Y_{XS}$  – коэффициент, показывающий количество образующейся биомассы  $\Delta x$  при количестве затраченного субстрата  $\Delta S$  за время  $\Delta t$ ;  $Y_{PS}$  – коэффициент, показывающий количество образующейся молочной кислоты при количестве затраченного субстрата  $\Delta S$  за время  $\Delta t$ ;  $m_s$  – коэффициент поддержания жизнедеятельности.

Кинетика биосинтеза молочной кислоты (рис. 6) описывается уравнением [4]:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_{P\max} \left( \frac{S}{K_P + S} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + \frac{P}{K_P}} \right) \cdot \frac{dX}{dt},$$

где  $\mu_{P\max}$  – максимальная удельная скорость биосинтеза молочной кислоты,  $\text{сут.}^{-1}$ ;  $S$  – количество глюкозы, г/л;  $K_P$  – константа ингибирования, мг/л;  $P$  – количество молочной кислоты, г/л.

В результате обработки экспериментальных данных получены кинетические коэффициенты, представленные в табл. 3.

Для оценки адекватности модели использовалась функция [5]:

$$\delta_i^j(t) = \max \left( \frac{|\xi^e(t) - \xi^m(t)|}{\xi^e(t)} \right) \cdot 100\%,$$

где  $\xi^e = (x^e, S^e, P^e)$ ,  $\xi^m = (x^m, S^m, P^m)$  – векторы экспериментальных и расчетных значений переменных модели.

Таблица 3

Кинетические коэффициенты

| Коэффициент   | Размерность     | Метод нахождения     | Значение |
|---------------|-----------------|----------------------|----------|
| $E_n$         | млн кл/мл       | По графику           | 90       |
| $K_S$         | мг/л            | Иди-Хофсти           | 11,1     |
| $K_P$         | мг/л            | Иди-Хофсти           | 8,56     |
| $\mu_{\max}$  | ч <sup>-1</sup> | Иди-Хофсти           | 0,1      |
| $m_s$         | –               | Наименьших квадратов | 0,0011   |
| $Y_{XS}$      | г/г             | Наименьших квадратов | 4,23     |
| $Y_{PS}$      | г/г             | Наименьших квадратов | 2,34     |
| $\mu_{P\max}$ | ч <sup>-1</sup> | Иди-Хофсти           | 0,39     |

Результат проверки адекватности модели:  $\delta = 7,79\%$ .

В результате проведенных исследований установлена возможность использования фильтрата, полученного после накопления биомассы микроводоросли *Chlorella*, в качестве стимулирующего вещества для получения молочной кислоты. Доказана эффективность использования аэрирования для накопления биомассы бактерий на стадии инокуляции.

Разработана математическая модель процесса культивирования молочнокислых бактерий штамма *B. coagulans*, позволяющая рассчитывать изменение биомассы бактерий, концентрации молочной кислоты и глюкозы в культуральной жидкости.

Список литературы

1. *Xu K., Xu P.* Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources // *Bioresource Technology*. 2014. № 5. P. 25-29.
2. *Ghaffara T. et al.* Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification // *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014. Vol. 7 (2). P. 222-229.
3. *Бондарчук С.С., Перевозкин В.П.* Математическое моделирование в популяционной экологии. Томск: Изд-во Томского гос. пед. ун-та, 2014. 233 с.
4. *Бирюков В.В.* Основы промышленной биотехнологии. М., 2004.
5. *Дворецкий Д.С. и др.* Математическое моделирование процессов и аппаратов химических, пищевых и биотехнологических производств. Тамбов, 2014. 80 с.

Поступила в редакцию 03.09.2018 г.  
Отрецензирована 05.10.2018 г.  
Принята в печать 26.10.2018 г.

**Информация об авторах:**

**Еськова Мария Александровна** – магистрант по направлению подготовки «Промышленная биотехнология». Тамбовский государственный технический университет, г. Тамбов, Российская Федерация. E-mail: mashaesko-va08@gmail.com

**Устинская Яна Витальевна** – магистрант по направлению подготовки «Промышленная биотехнология». Тамбовский государственный технический университет, г. Тамбов, Российская Федерация. E-mail: ustinskaya.yana@yandex.ru

**MATHEMATICAL MODELLING OF LACTIC ACID BIOSYNTHESIS BY A STRAIN *BACILLUS COAGULANS B-10468***

**Eskova M.A.**, Master's Degree Student in "Industrial Biotechnology" Programme. Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation. E-mail: mashaesko-va08@gmail.com

**Ustinskaya Y.V.**, Master's Degree Student in "Industrial Biotechnology" Programme. Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation. E-mail: ustinskaya.yana@yandex.ru

*Abstract.* We examine the influence of filtrate after cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2 and aeration regime on the process of lactic acid biosynthesis, furthermore we create a mathematical model of the process. The stimulating effect of filtrate on lactic acid accumulation and aeration on bacterial biomass growth was established.

*Keywords:* lactic acid; *Chlorella vulgaris*; modelling

Received 3 September 2018

Reviewed 5 October 2018

Accepted for press 26 October 2018