

Научная статья
УДК 579.66
EDN: QWSTSZ
DOI: 10.21285/achb.948



Исследование продуктивности и свойств штамма *Weizmannia coagulans*, способного синтезировать L-молочную кислоту

Н.Л. Ертилецкая✉, А.А. Суханова, А.Н. Бояндин,
А.А. Середа, С.Н. Сырцов, Ю.А. Прокопчук

Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
Красноярск, Российская Федерация

Аннотация. Исследования продуцентов L-молочной кислоты на сегодняшний день представляются весьма актуальными в связи с широкими сферами ее применения. Целью проведенного исследования являлся подбор параметров культивирования термофильного штамма-продуцента L-молочной кислоты *Weizmannia coagulans*, выделенного из молока. В ходе работы выявлено, что продуктивность штамма зависит от температуры культивирования, скорости перемешивания, pH среды, использованного нейтрализующего агента и концентрации глюкозы. По результатам культивирования в колбах и ферментере установлено, что за 56 часов штамм способен продуцировать до 80,4 г/л молочной кислоты при соответствующей средней продуктивности 1,44 г/(л×ч) с конверсией порядка 99%. Самыми оптимальными параметрами для получения наибольших показателей были температура 50 °С, pH среды 6,5, перемешивание 150 об/мин. Показано, что данный штамм не ингибируется высокими концентрациями глюкозы, а, напротив, демонстрирует большую продуктивность при концентрации глюкозы в среде 100–120 г/л. Среди нейтрализующих агентов, используемых для корректировки pH, выбран Са(ОН)₂, который в наименьшей степени влияет на размер клеток продуцента в процессе ферментации и побочные продукты использования которого наименее токсичны. Полученные результаты показывают, что данный штамм требует дальнейших исследований его особенностей метаболизма и генетической модификации для повышения продуктивности, снижения ингибирующего эффекта целевого продукта на метаболизм продуцента и получения повышенных титров молочной кислоты за короткое время ферментации.

Ключевые слова: *Weizmannia coagulans*, молочнокислородное брожение, L-молочная кислота, периодическое культивирование, биотехнологическое получение органических кислот

Финансирование. Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания на выполнение исследования по теме «Исследование закономерностей химико-биотехнологического синтеза биоразлагаемых полимеров» (проект № FEFE-2024-0027).

Для цитирования: Ертилецкая Н.Л., Суханова А.А., Бояндин А.Н., Середа А.А., Сырцов С.Н., Прокопчук Ю.А. Исследование продуктивности и свойств штамма *Weizmannia coagulans*, способного синтезировать L-молочную кислоту // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 525–536. DOI: 10.21285/achb.948. EDN: QWSTSZ.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Productivity and properties of a *Weizmannia coagulans* strain capable of synthesizing L-lactic acid

Natalya L. Ertiletskaya✉, Anna A. Sukhanova, Anatoly N. Boyandin,
Anna A. Sereda, Sergei N. Syrtsov, Yulia A. Prokopchuk

Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Studies on the producers of L-lactic acid are highly relevant at the moment due to the broad scope of its applications. This study was aimed at selecting culture parameters for a milk-derived thermophilic strain of *Weizmannia*

© Ертилецкая Н.Л., Суханова А.А., Бояндин А.Н., Середа А.А., Сырцов С.Н., Прокопчук Ю.А., 2024

coagulans that is capable of producing L-lactic acid. It was found that the strain productivity depends on the culture temperature, stirring rate, medium pH, used neutralizing agent, and glucose concentration. The culture in flasks and a fermenter revealed that in 56 hours, the strain is capable of producing up to 80.4 g/L of lactic acid at a corresponding average productivity of 1.44 g/(L×h) with a conversion of about 99%. The most optimal parameters to achieve the highest indicators were a temperature of 50 °C, medium pH of 6.5, and a stirring rate of 150 rpm. This strain was shown to be uninhibited by high glucose concentrations; conversely, it exhibited higher productivity at glucose concentrations of 100–120 g/L in the medium. Among the neutralizing agents used for pH adjustment, the Ca(OH)₂ agent was selected, which has the least effect on the size of producer cells during fermentation and whose by-products are the least toxic. The obtained results indicate that further studies on the metabolic properties and genetic modification of this strain are required in order to increase productivity, reduce the inhibitory effect of the target product on the metabolism of the producer, and obtain elevated lactic acid titers in a short fermentation time.

Keywords: *Weizmannia coagulans*, lactic acid fermentation, L-lactic acid, batch culture, biotechnological production of organic acids

Funding. The Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation supported this study within the state assignment for the implementation of the project “Study of the common principles of chemico-biotechnological synthesis of biodegradable polymers and development of an integrated technology for the production of engineering composite materials with controlled biodegradation for industrial use” (project no. FEFE-2024-0027).

For citation: Ertiletskaya N.L., Sukhanova A.A., Boyandin A.N., Sereda A.A., Syrtsov S.N., Prokopchuk Yu.A. Productivity and properties of a *Weizmannia coagulans* strain capable of synthesizing L-lactic acid. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):525-536. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.948. EDN: QWSTSZ.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время исследования продуцентов молочной кислоты среди отечественных и зарубежных ученых являются весьма актуальными [1–3], что, безусловно, связано с широкими сферами ее применения в пищевой и непищевой промышленности, в том числе в качестве мономера для синтеза биоразлагаемых пластиков [4]. Кроме того, увеличение спроса на такой пластик, как полилактид, повышает и спрос на молочную кислоту заведомо надлежащего качества – главным образом энантиомерно чистую молочную кислоту, содержащую L-изомер [5]. В связи с этим важным направлением работ по синтезу молочной кислоты является выделение новых штаммов и изучение их биологических свойств, селекция существующих активных штаммов-продуцентов и гомоферментативных молочнокислых бактерий, способных синтезировать преимущественно L-молочную кислоту с учетом оптимизации параметров биосинтеза.

Среди продуцентов L-молочной кислоты наиболее часто упоминаются *Lactococcus lactis*, *Lactococcus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* и ряд других истинных молочнокислых бактерий [6–11]. Однако, несмотря на то, что продуктивность данных штаммов может быть достаточно высокой (до 7,5 г/(л×ч)) [6], все они являются мезофилами с верхней границей температурного оптимума не более 42 °C. Между тем сдвиг границы температурного оптимума в сторону более высоких значений практически сводит к нулю риск контаминации сторонней микрофлорой, что является довольно распространенной проблемой в микробиологическом производстве. Использование термофильных продуцентов позволяет совместить процесс молочнокислого брожения с осахариванием целлюлозо-содержащего сырья, которое, как правило, происходит при повышенных температурах [12].

Среди термофильных видов бактерий *Weizmannia coagulans* способен к гомоферментативному синтезу молочной кислоты при относительно высоких значениях продуктивности. Этот вид, ранее известный как *Vacillus coagulans*, недавно был филогенетически реклассифи-

цирован в отдельную монофилетическую группу под названием *Weizmannia* [13]. *W. coagulans* – это грамположительная непатогенная спорообразующая бактерия, продуцирующая молочную кислоту [14]. Известно, что данный вид микроорганизмов относится к микрофлоре молока и молочных продуктов, причем он является одним из тех видов, что остаются даже после пастеризации. Существуют сведения, что данный вид обитает в почве, на поверхности овощей и фруктов (об этом свидетельствует их наличие в микрофлоре консервированных продуктов), в силосных ямах и навозе [15, 16].

В литературных источниках представлены данные об использовании различных штаммов *W. coagulans* для эффективного получения молочной кислоты из различных углеродных субстратов, в том числе из гидролизатов растительных остатков. В частности, в работе Т. Михельсон с соавторами показано, что штамм *W. coagulans* SIM-7 способен расти на средах, содержащих менее сложный источник азота (дрожжевой автолизат) по сравнению с *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20073, и давать высокий титр молочной кислоты [17]. Оптимум роста *W. coagulans* при температурах 45–55 °C практически сводит к нулю риск контаминации культуры и, как показано в некоторых источниках, не требует предварительной стерилизации питательной среды [18, 19]. В литературе неоднократно отмечено значительное преимущество данного штамма, а именно то, что он продуцирует L-молочную кислоту с высокой степенью энантиомерной чистоты (от 97,2 до 99,6%) [19, 20]. Кроме того, С. Чжоу и др. в своей работе показали, что один из штаммов *W. coagulans* (*W. coagulans*) обладает толерантностью к высокой концентрации глюкозы. При периодическом культивировании продуцент полностью израсходовал 240 г/л глюкозы, и выход L-молочной кислоты за 60 ч культивирования при этом составил 210 г/л L-молочной кислоты при продуктивности 3,5 г/(л×ч). В этой же работе одновременное осахаривание крахмала и ферментация при 50 °C без стерилизации среды позволили достичь выхода 202,0 г/л L-молочной кислоты за 48 ч [18]. Этот результат можно считать выдающимся, поскольку до этого времени при таком способе

получения молочной кислоты удавалось получать не более 55,99 г/л молочной кислоты за 49 ч ферментации.

В России исследований о культивировании *W. coagulans* не представлено: в основном описано культивирование таких продуцентов молочной кислоты, как *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracase*, кокковых форм *Lactococcus* и данные перспективного штамма дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [21]. В работе, описывающей проведенные нами ранее исследования, отмечено, что штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 и *Lactobacillus acidophilus* 5 Дс продуцируют рацемическую (DL)-молочную кислоту, а штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* продуцирует молочную кислоту с содержанием L-изомера 73% [22]. Таким образом, выделение нового штамма и последующая оптимизация его свойств является перспективным направлением в исследовании продуцентов молочной кислоты и требует его тщательного изучения для пополнения коллекции российских штаммов-продуцентов.

В данной работе исследованы характеристики и продуктивность термофильного штамма-продуцента *W. coagulans*, выделенного из молока, для дальнейшего его применения в высокоэффективном процессе получения молочной кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве субстрата для выделения молочнокислых бактерий использовали молоко пастеризованное 2,5%. На первом этапе выделения в стерильную колбу объемом 250 мл асептически вносили около 100 мл молока и инкубировали в термостате при температуре 45 °С в течение 24 ч. Через 24 ч содержимое колбы использовали для приготовления разведений. Посевы инкубировали при температуре 45 °С в течение 3 суток. По истечении 3 суток чашки с посевами осматривали, выделяли однородные колонии и пересевали на скошенный агар де Мана – Рогозы – Шарпа (MRS) (Laboratorios CONDA, Испания), затем снова инкубировали при 45 °С в течение 3 суток. Полученные выделенные чистые культуры микроорганизмов использовали для исследований (продукция молочной кислоты, микроскопия и определение видовой принадлежности на масс-спектрометре и 16S-РНК анализом). Выделенную культуру *W. coagulans* в дальнейшем поддерживали на полужидком агаре MRS, который готовили из бульона MRS (НЦП «Биокомпас-С», Россия) с добавлением 0,3% агара.

Видовую принадлежность выделенного продуцента молочной кислоты определяли с помощью анализа 16S-РНК в лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск). Определенный термофильный штамм *W. coagulans* (не запатентован) сохранен в качестве музейной культуры Отдела биоразлагаемых полимерных материалов Сибирского государственного университета науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва. Анализ соотношения изомеров молочной кислоты, продуцируемой выделенным штаммом, определяли по методике, описанной ранее в статье [22].

Исследование влияния состава среды на рост и продуктивность *W. coagulans* проводили в колбах ($n = 3$), содержащих 100 мл одной из питательных сред (бульон MRS, бульон МС1, бульон МС2 и среда с кукурузным экстрактом) в шейкере-инкубаторе ZQTY-70 (Shanghai

Zhichu Instrument Co., Ltd., Китай) при 45, 50 или 55 °С в течение 56 ч при 150 об/мин. После засева и во время культивирования из колб отбирали по 1 мл среды для подсчета клеток, определения глюкозы, молочной кислоты и оптической плотности ранее описанными методами [22]. В качестве нейтрализующего агента использовали CaCO_3 в количестве 10% (10 г). По результатам культивирования определили и сравнили средние значения потребления субстрата и производства молочной кислоты, продуктивность процесса и конверсию. Продуктивность культивирования Y_p за промежуток времени dt считали по следующей формуле:

$$Y_p = \frac{dP}{dt},$$

где dP – прирост в концентрации молочной кислоты, г*л, за временной промежуток dt , ч.

Конверсию субстрата C_s вычисляли по формуле:

$$C_s = \frac{\Delta S}{\Delta P} \times 100\%,$$

где ΔS и ΔP – потребление субстрата и выход молочной кислоты за все время культивирования.

Для культивирования *W. coagulans* были использованы следующие среды:

1. Бульон МС1 (на 1000 мл дистиллированной воды): глюкоза – 50,0–70,0 г, триптон ферментативный – 5,0 г, дрожжевой экстракт – 1,0 г [23].

2. Бульон МС2 (на 1000 мл дистиллированной воды): глюкоза – 100,0 г, дрожжевой экстракт – 2,0 г, аммоний серноокислый – 1,7 г, аммоний фосфорнокислый – 1,0 г [23].

3. Среда с кукурузным экстрактом (на 1000 мл дистиллированной воды): глюкоза – 100,0 г, кукурузный экстракт – 40,0 г, калий фосфорнокислый 2-замещенный 3-водный – 6,25 г.

Исследование влияния температуры на рост и продуктивность *W. coagulans* проводили в колбах ($n = 3$), содержащих 100 мл бульона МС1 в шейкере-инкубаторе при 45, 50 или 55 °С в течение 56 ч при 150 об/мин. После засева и во время культивирования из колб отбирали по 1 мл среды для подсчета клеток, определения глюкозы, молочной кислоты и оптической плотности ранее описанными методами [22]. В качестве нейтрализующего агента использовали CaCO_3 в количестве 10% (10 г). По результатам культивирования определили и сравнили средние значения потребления субстрата и производства молочной кислоты, продуктивность процесса и конверсию.

Исследование влияния скорости перемешивания на рост и продуктивность *W. coagulans* проводили по аналогичной схеме, как и подбор температуры, с сохранением постоянной температуры ферментации на уровне 50 °С в шейкере-инкубаторе при скорости перемешивания 100, 150, 250 или 300 об/мин. Количество параллелей, периодичность отбора проб и определения параметров были такими же, как указано ранее.

Исследования по влиянию исходной концентрации глюкозы на *W. coagulans* проводили по аналогичной предыдущим экспериментам схеме с тем отличием, что во всех экспериментах температура ферментации и скорость перемешивания были постоянными (50 °С и 150 об/мин соответственно), но менялась начальная концентрация глюкозы в среде – 20, 50, 70, 100 и 120 г/л. Количество параллелей, периодичность отбора проб и определения параметров были те же.

Для исследования влияния щелочного агента на *W. coagulans* засеив колбы со 100 мл среды для культивирования производили аналогично предыдущим экспериментам с добавлением одного из щелочных агентов (10%-й раствор гидроксида натрия, 10%-й раствор гидроксида аммония или порошок гидроксида кальция). Водородный показатель регулировали вручную при каждом отборе проб до значений 6,5–6,7. Культивирование проводили в течение 56 ч при 150 об/мин и температуре 50 °С. При микроскопировании проб делали фотографии для дальнейшего сравнения размера клеток и оценки влияния щелочного агента на морфологию клеток в разные часы культивирования.

Оптимальный pH для культивирования нового штамма подбирали в режиме ферментации в биореакторе (Biosore, Китай) объемом 5 л (рабочий объем 3 л) с возможностью автоматического поддержания pH. Инокулят готовили внесением рабочей культуры из трех пробирок с полужидкой средой MRS и инкубацией в колбе в шейкере-инкубаторе при 50 °С и 150 об/мин 24 ч. Далее инокулят в объеме 300 мл (10% от рабочего объема) с концентрацией клеток $(3,8-5,4) \times 10^8$ КОЕ/мл асептически вносили в заранее простерилизованный ферментер с соответствующим количеством среды для культивирования (2,7 л). Сразу после внесения отбирали пробы для подсчета клеток и определения концентрации глюкозы и молочной кислоты. Далее отбор проб и определение глюкозы и молочной кислоты производили 3 раза в сутки, подсчет клеток – 1 раз в сутки. Длительность культивирования составила 56 ч. pH поддерживали автоматическим добавлением 15%-го раствора гидроксида кальция на уровне 5,5, 6,0, 6,5 или 7,0. По результатам культивирования ($n = 2$) определили и сравнили средние значения потребления субстрата и производства молочной кислоты, продуктивности процесса и конверсии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам 16S-ПНК анализа доказано, что полученный микроорганизм принадлежит к виду *W. coagulans* и содержит следующую нуклеотидную последовательность:

TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTGAAATCTT
 GCGGCTCAACCGCAAGCGGTCATTGGAAACTGGGAGGCTT
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGCGGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
 GAGCAACAGG.

По результатам хроматографического анализа ментиловых эфиров молочной кислоты, содержащейся в питательной среде после предварительного культивирования данного штамма в 10 мл жидкой среды MRS, установлено, что *W. coagulans* продуцирует преимущественно L-молочную кислоту с энантиомерной чистотой 95,4% (рис. 1).

Влияние состава среды на рост и продуктивность *W. coagulans* исследовано на средах MRS, MC1, MC2 и среде с кукурузным экстрактом. Установлено, что наибольшие значения выхода молочной кислоты при культивировании *W. coagulans* получены на средах MRS и MC1 (рис. 2).

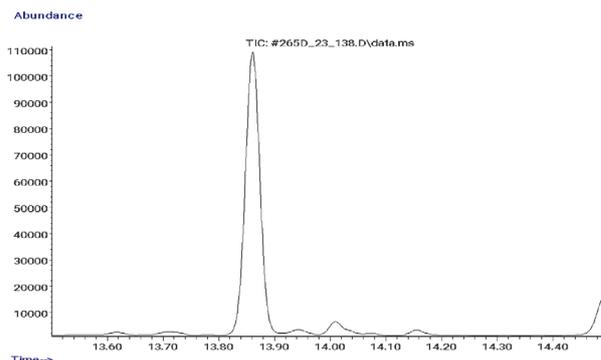


Рис. 1. Результаты хроматографического анализа культуральной жидкости штамма *Weizmannia coagulans* при выращивании на среде MRS (пик на 13,86 мин соответствует деривативу L-молочной кислоты)

Fig. 1. Results of GC-MS analysis of the culture broth of *Weizmannia coagulans* new strain fermented on MRS medium (the peak at 13.86 min corresponds to the L-lactic acid derivative)

Выход молочной кислоты при периодическом культивировании штамма *W. coagulans* на средах MRS и MC1 составил 40 и 69 г/л, соответствующие значения продуктивности составили 0,71 и 1,23 г/(л×ч) (табл. 1).

Таблица 1. Результаты периодического культивирования штамма *Weizmannia coagulans* на различных питательных средах

Table 1. Results of batch fermentation of *Weizmannia coagulans* new strain using various nutrient media

Показатель	Питательная среда			
	MRS	MC1	MC2	КЭ*
Начальная концентрация клеток, КОЕ/мл×10 ⁷	1,07	0,95	1,2	1,01
Выход молочной кислоты, г/л	40,0	69,0	4,2	4,5
Продуктивность, г/(л×ч)	0,71	1,23	0,07	0,08
Потребление глюкозы, г/л	41,1	79,2	45,3	45,5
Конверсия, %	97,3	87,0	9,3	9,9

Примечание. * – среда с кукурузным экстрактом.

Культивирования *W. coagulans* на среде MC2 и среде с кукурузным экстрактом оказались неэффективными из-за крайне низких значений продуктивности при относительно высоком значении потребляемого субстрата. Это можно объяснить тем, что в этих средах отсутствует достаточное количество аминокислот, необходимых для роста и жизнедеятельности бактерий, которые обычно добавляют в виде триптона или пептона. Используемый дрожжевой экстракт в среде MC2 по содержанию белковых форм азота уступает гидролизатам животных тканей. Кроме того, присутствие минеральных источников азота (соли аммония) в среде MC2 дополнительно указывает на то, что именно недостаток аминокислот негативно сказывается на жизнедеятельности бактериальной культуры. Среда MRS и MC1 в большей степени подходят для культивирования данного штамма. Однако, несмотря на несколько сниженное значение конверсии на среде MC1 по сравнению со средой MRS, было принято решение этим пренебречь из-за разности в стоимости

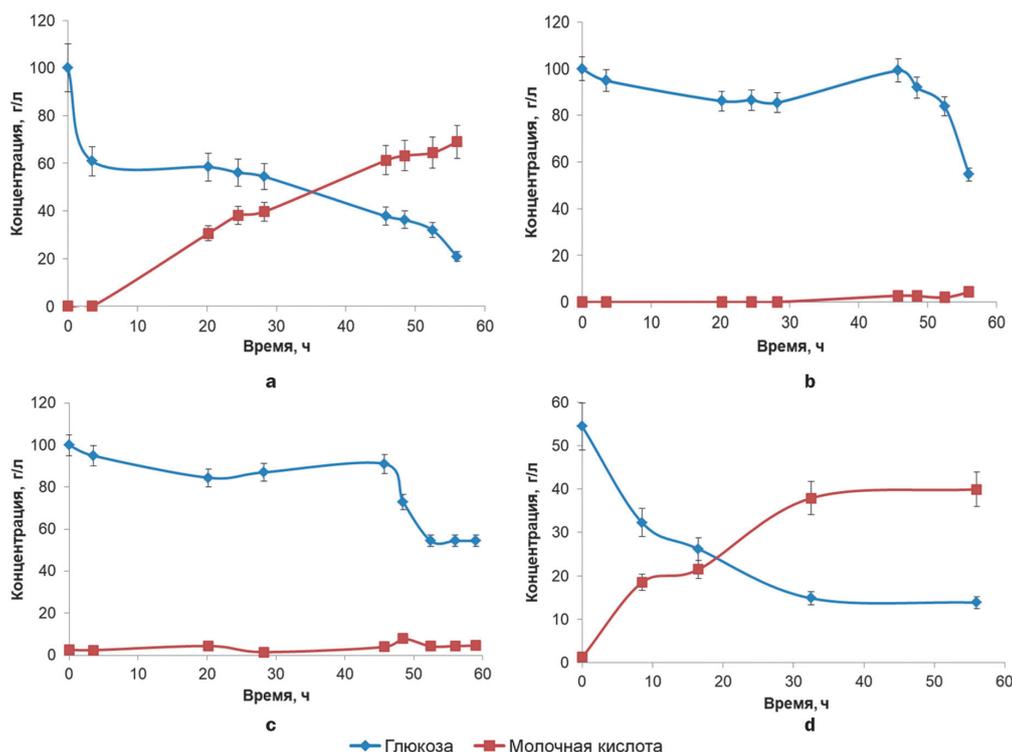


Рис. 2. Результаты периодического культивирования штамма *Weizmannia coagulans* на питательных средах: а – МС1; б – МС2; с – среда с кукурузным экстрактом; д – МРС

Fig. 2. Results of batch fermentation of *Weizmannia coagulans* new strain using various nutrient media: а – MM1; б – MM2; с – corn steep liquor medium; д – MRS medium

данных питательных сред (в среде MRS больше компонентов, за счет чего ее стоимость за килограмм выше), которая нивелирует разницу в конверсии. В последующих исследованиях в качестве среды для культивирования *W. coagulans* использовали среду МС1.

Большинство молочнокислых бактерий относится к мезофилам и растет при умеренных температурах (от 30 до 45 °С). Такой температурный режим, вероятно, связан с условиями естественных сред обитания, главной из которых является желудочно-кишечный тракт человека и других млекопитающих. Как было упомянуто выше, указанный температурный режим требует тщательного соблюдения стерильных условий, что создает дополнительные проблемы при промышленном культивировании молочнокислых бактерий. В таком случае термофильные микроорганизмы более предпочтительны, поскольку температуры их оптимума роста не позволяют развиваться сторонней микрофлоре. Определение оптимума роста продуцента является одной из первостепенных задач на этапе подбора высокоэффективного продуцента молочной кислоты, поскольку именно оптимальная температура считается идеальной средой для клеток и для синтеза ими целевого продукта [24].

При исследовании влияния температуры инкубирования на рост штамма *W. coagulans* было установлено, что из исследованных значений температуры наиболее оптимальной с точки зрения конечного титра молочной кислоты была температура 50 °С (табл. 2). Выход молочной кислоты через 56 ч культивирования составил 80,4 г/л, продуктивность – 1,44 г/(л×ч). В то же время для температурных режимов 45 и 55 °С те

же показатели были на уровне 47,9 и 63,3 г/л и 0,86 и 1,13 г/(л×ч) соответственно. При этом количество потребляемой глюкозы было на уровне 58,8, 81,5 и 65,9 г/л для 45, 50 и 55 °С соответственно. Наибольшая конверсия, соответственно, наблюдалась при культивировании при температуре 50 °С.

Таблица 2. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных температурах

Table 2. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different temperatures

Показатель	Температура, °С		
	45	50	55
Выход молочной кислоты, г/л	47,89	80,44	63,35
Продуктивность, г/(л×ч)	0,86	1,44	1,13
Потребление глюкозы, г/л	58,84	81,49	65,94
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	151,5	190,8	65,8
Конверсия, %	81,4	98,7	96,2

Помимо прочего стоит отметить, что при температуре 45 и 55 °С продукция молочной кислоты прекратилась уже после 48 ч, в то время как ферментация при 50 °С все еще продолжалась, хотя и продуктивность между 48 и 56 ч снизилась и была на уровне 0,13 г/(л×ч). Что касается изменения концентрации клеток, то численность клеток в ходе культивирования при 50 °С возросла более чем в 190 раз, при 45 °С – в 151 раз, при 55 °С – в 66 раз.

В лабораторной микробиологической практике оптимальная температура роста продуцента, как правило, значительно ближе к максимальной, чем к минимальной. При этой температуре полностью меняется реакция роста на изменение температуры, а фактическая скорость роста представляет собой компромисс между активирующим и тормозящим действием температуры. Таким образом, клетки, выращенные при оптимальной температуре, уже частично ингибируются температурой. Изменение температуры роста в сторону повышения, как правило, значительно снижает рост клеток, так как происходит инактивация большей части ферментов бактериальной клетки. Кроме того, в случае спорообразующих бактерий, к которым относится *W. coagulans*, повышенные температуры могут индуцировать спорообразование. Понижение температуры влияет главным образом на состояние клеточной мембраны, снижая ее текучесть, что отражается в нарушении транспорта веществ между клеткой и окружающей средой [24] и закономерном снижении продуктивности, как было показано в проведенном нами исследовании при 45 °С.

В работах других авторов, посвященных исследованию *W. coagulans* (*B. coagulans*), указаны температурные оптимумы 50–52 °С [25–27], различия в выходе молочной кислоты при которых, как правило, незначительны. Однако показано, что при более высоких температурах (57 °С) наблюдается значительное снижение продуктивности [23].

Перемешивание среды является одним из важных факторов ферментации, обеспечивающим максимальную продуктивность процесса. Перемешивание в условиях инкубаторов осуществляется посредством создающего центробежную силу вращения платформы и может влиять на массоперенос и в некоторой степени на аэрацию процесса.

По результатам подбора скорости перемешивания культуры штамма *W. coagulans* было установлено, что самым оптимальным является перемешивание при 150 об/мин, при котором выход молочной кислоты за 56 ч составил 80,4 г/л (табл. 3). При перемешивании со скоростью 100, 250 и 300 об/мин выходы молочной кислоты снизились и составили 55,8, 47,1 и 40,6 г/л соответственно. Продуктивность, соответственно, так же была различной – 1,0, 1,44, 0,84 и 0,59 г/(л×ч) по возрастанию скорости перемешивания.

Таблица 3. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных скоростях перемешивания

Table 3. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different stirring rates

Показатель	Перемешивание, об/мин			
	100	150	250	300
Выход молочной кислоты, г/л	55,77	80,44	47,13	40,65
Продуктивность, г/(л×ч)	1,00	1,44	0,84	0,59
Потребление глюкозы, г/л	56,12	81,49	63,68	66,60
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	36,0	190,8	95,2	137,1
Конверсия, %	99,4	98,7	74,0	50,0

Изменение концентрации клеток через 24 ч значительно различалось для разных скоростей перемешивания. При скорости перемешивания 100 об/мин концентрация клеток через 24 ч увеличилась в 36 раз, тогда как этот же показатель увеличился в 95, 137 и более чем 190 раз при скоростях перемешивания 250, 300 и 150 об/мин соответственно. Наибольшая конверсия субстрата на уровне 98–99% наблюдалась при скоростях перемешивания 100 и 150 об/мин при том, что при увеличении оборотов она снижалась до 50%.

Полученные результаты показывают, что скорость перемешивания 150 об/мин является наиболее оптимальной для данного штамма, что отразилось в показателях продуктивности и изменении численности клеток.

Продукция молочной кислоты гомоферментативными молочнокислыми бактериями происходит по пути Эмбдена – Майергофа – Парнаса, в котором исходным субстратом является глюкоза. Глюкоза может попадать в бактериальную клетку напрямую из среды посредством диффузии через клеточную мембрану либо опосредованно в результате превращений других сахаров (лактоза, мальтоза, целлобиоза и др.) [28]. Однако, несмотря на возможность использования самых разных субстратов, в числе которых растительные отходы сельского хозяйства, в условиях промышленного производства глюкоза все еще остается самым часто используемым.

Разные виды продуцентов молочной кислоты обладают различной толерантностью к концентрациям глюкозы в среде. Во время культивирования продуцентов молочной кислоты осмотическое давление, вызванное глюкозой, повышается из-за избыточных источников углерода, что приводит к задержке роста клеток и низкой эффективности производства [23, 29].

По результатам культивирования нового штамма *W. coagulans* при различных начальных концентрациях глюкозы установлено, что при начальных концентрациях глюкозы 20, 50, 70, 100 и 120 г/л за 56 ч культивирования средние значения выхода молочной кислоты находились в диапазоне от 54,1 до 67,1 г/л (табл. 4).

Таблица 4. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных начальных концентрациях глюкозы

Table 4. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different initial glucose concentrations

Показатель	Начальная концентрация глюкозы, г/л				
	20	50	70	100	120
Выход молочной кислоты, г/л	54,07	57,43	52,12	67,10	62,21
Продуктивность, г/(л×ч)	0,97	1,03	0,93	1,20	1,11
Потребление глюкозы, г/л	55,60	72,02	53,02	71,72	70,08
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	96,8	58,0	7,7	5,8	7,7
Конверсия, %	97,2	79,7	96,4	93,6	88,8

Суммарное потребление глюкозы за все время культивирования отличалось и составило 55,6, 72,0, 53,0, 71,7 и 70,1 г/л глюкозы с конверсией 97,2, 79,7, 94,4, 93,6, и 88,8% соответственно. Концентрация клеток в среде

через 24 ч от начала культивирования значительно повысилась (в 60–100 раз) при более низких концентрациях глюкозы (20 и 50 г/л), в то время как при концентрациях 70, 100 и 120 г/л этот показатель вырос всего в 6–8 раз.

Стоит отметить, что при культивировании с начальными концентрациями 20 и 50 г/л по мере исчерпания субстрата вносили подпитку (раствор глюкозы 700 г/л): в случае начальной концентрации 20 г/л – по 4 мл раствора через 12 и 30 ч от начала культивирования, в случае 50 г/л – 3 мл раствора через 33 ч от начала культивирования. По окончании культивирования остаточное содержание субстрата в соответствующих колбах составляло менее 10 г/л.

Полученные результаты показывают, что данный штамм *W. coagulans* не ингибируется высокими концентрациями глюкозы, а, напротив, демонстрирует большую продуктивность при концентрации глюкозы в среде 100–120 г/л. Более того, ферментация в таких условиях позволяет обойтись без дополнительных подпиток субстратом, что снижает трудозатратность процесса.

Характерной чертой молочнокислого брожения является значительное падение водородного показателя вследствие накопления молочной кислоты, которое отражается на жизнедеятельности продуцента. В частности, низкие значения pH среды приводят к снижению внутриклеточного pH и потере активности клеточных ферментов за счет их высокого протонирования и изменения заряда, что отражается в значительном снижении продуктивности продуцента и ингибировании его роста [30].

Выбор подходящего щелочного агента для поддержания pH процесса зависит от разных факторов, в частности от культуры-продуцента, состава среды, предполагаемого способа дальнейшей очистки и др.

В данной работе подбор оптимального щелочного агента проводили путем ферментации на колбах при периодическом добавлении щелочного агента через определенные промежутки времени при падении pH ниже 5,5

По результатам эксперимента было установлено, что среди исследованных щелочных агентов наиболее оптимальным в плане выхода молочной кислоты и влияния на морфологию клеток *W. coagulans* является гидроксид кальция (табл. 5). Выход молочной кислоты при использовании этого щелочного агента был в 2 раза выше по сравнению с культивированиями при использовании гидроксидов натрия и аммония.

Таблица 5. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* с использованием различных щелочных агентов (нерегулярное поддержание pH)

Table 5. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation using different neutralizing agents (irregular pH maintenance)

Показатель	Щелочной агент		
	NaOH	NH ₄ OH	Ca(OH) ₂
Выход молочной кислоты, г/л	5,03	5,84	10,17
Продуктивность, г/(л×ч)	0,09	0,10	0,18
Потребление глюкозы, г/л	29,68	29,98	26,76
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	99,1	82,6	47,6
Конверсия, %	16,9	19,5	38,0

Установлено, что при культивировании с добавлением различных щелочных агентов средний размер клеток через 24 и 48 ч культивирования различался. В частности, при культивировании с добавлением гидроксидов натрия и аммония средний размер клеток через 24 ч составлял 29,6±21,3 и 41,5±15,3 мкм, через 48 ч – 38,5±14 и 43,0±16,9 мкм соответственно (рис. 3). При добавлении гидроксида кальция соответствующее значение через 24 и 48 ч составило 80,6±28,7 и 73,3±4,8 мкм. Средний размер клеток *W. coagulans* в начале культивирования составил 130,7±95,0 мкм.

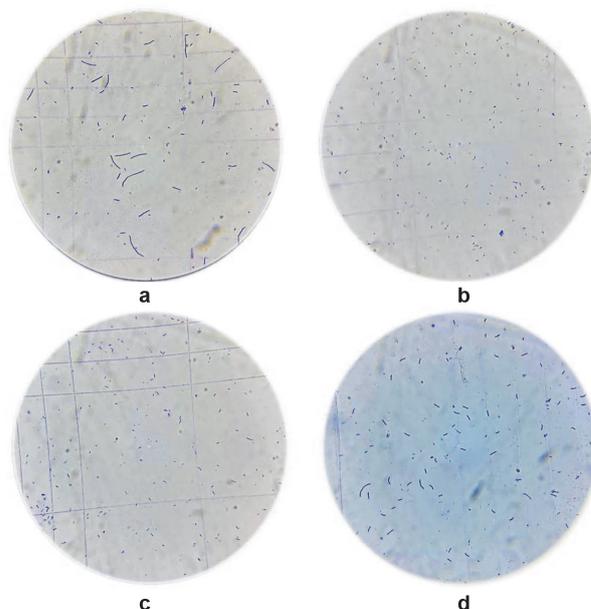


Рис. 3. Клетки *Weizmannia coagulans* при культивировании с использованием различных щелочных агентов: а – до добавления щелочных агентов (0 часов); б – подщелачивание гидроксидом натрия (24-й час); в – подщелачивание гидроксидом аммония (24-й час); д – подщелачивание гидроксидом кальция (24-й час) (увеличение 400х, окрашивание генцианвиолетом)

Fig. 3. *Weizmannia coagulans* cells fermented using different neutralizing agents: а – before neutralization (0 h); б – neutralization with sodium hydroxide (24th h); в – neutralization with ammonium hydroxide (24th h); д – neutralization with calcium hydroxide (24th h) (400x magnification, stained with gentian violet)

Эти результаты показывают, что при использовании гидроксида кальция в качестве щелочного агента размер клеток больше, чем при использовании гидроксида натрия и гидроксида аммония. Вероятно, это связано с тем, что по сравнению с гидроксидами аммония и натрия, которые при взаимодействии с молочной кислотой образуют лактаты аммония и натрия соответственно, при большом накоплении в среде вызывающие у продуцента осмотический стресс, Ca(OH)₂ осаждает молочную кислоту в виде лактата кальция, тем самым снижая ее токсичное влияние на рост и морфологию бактериальной клетки [31].

Культивирование продуцента при оптимальном значении pH позволяет поддерживать жизнедеятель-

ность продуцента на должном уровне и обеспечивает стабильное протекание его метаболических процессов, что положительно сказывается на его продуктивности. Культивирование при значениях pH ниже оптимальных обычно приводит к сокращению или полному прекращению продукции молочной кислоты, поскольку в этом случае изменяется структура клеточной мембраны и, как следствие, нарушается работа перистальтических систем клетки, которые обеспечивают выход продуцируемых веществ во внешнюю среду [32]. Кроме того, при низких значениях pH молекулы синтезируемой молочной кислоты оказываются в среде в протонированной (незаряженной) форме, что позволяет им беспрепятственно возвращаться обратно в бактериальную клетку путем диффузии [31]. Внутренние ресурсы клетки при этом перенаправляются на выравнивание кислотно-щелочного баланса посредством синтеза соединений сторонних метаболических путей. На настоящий момент механизмы, обеспечивающие регулирование внутриклеточного pH *W. coagulans*, полностью не исследованы, однако есть сведения, что в этом участвует белок MFS путем транспортировки H⁺ с внутриклеточной стороны на внеклеточную сторону при транспортировке его субстрата [33].

По результатам серии культивирований установлено, что оптимальный диапазон культивирования нового штамма *W. coagulans* составляет 6,0–7,0, причем, если сравнивать крайние значения этого диапазона и среднее значение (pH 6,5), отличия в выходе молочной кислоты незначительны (табл. 6). В частности, выход молочной кислоты при культивировании при значениях pH данного диапазона был на уровне 51,4–52,6 г/л за 56 ч. При этом при культивировании при pH 5,5 выход снизился до 34,0 г/л.

Точно так же продуктивность была практически одинаковой для значений pH 6,0, 6,5 и 7,0, тогда как при pH 5,5 она была ниже на 0,2–0,3 г/л. Интересно, что численность клеток при этом значительно не отличалась. Это может указывать на то, что в случае пониженного pH внутренние ресурсы клеток задействованы в адаптации к пониженному pH в ущерб продукции молочной кислоты. Ю. Чэнь с соавторами при помощи геномного модели-

Таблица 6. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных значениях pH

Table 6. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different pH

Показатель	pH			
	5,5	6,0	6,5	7,0
Выход молочной кислоты, г/л	33,88	51,44	52,26	47,40
Продуктивность, г/(л×ч)	0,60	0,92	0,93	0,85
Потребление глюкозы, г/л	56,16	60,99	57,04	48,89
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	17,2	12,4	26,7	14,0
Конверсия, %	60,3	84,3	91,6	97,0

рования одного из штаммов *W. coagulans* установили, что гликолитические потоки, представленные реакцией образования фруктозо-6-фосфата, уменьшались при pH 5,5, что отразилось в снижении потребления глюкозы. При этом потоки фосфокетолазного и ацетаткиназного путей, наоборот, стимулировались, что означает, что потоки углерода были перенаправлены в сторону пути фосфокетолазы. Между тем цепь переноса электронов показала повышенные потоки при pH 5,5 [34]. Эти данные означают, что *W. coagulans* может использовать несколько механизмов адаптации к пониженному pH.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам проведенных экспериментов, наибольший достигнутый выход молочной кислоты в ходе культивирования нового штамма *W. coagulans* при оптимальных параметрах (50 °C, 150 об/мин, pH 6,5, начальная концентрация глюкозы 100–120 г/л) за 56 ч составил 80,4 г/л при соответствующей средней продуктивности 1,43 г/(л×ч). Полученные результаты показывают, что данный штамм требует дальнейших исследований его особенностей метаболизма и генетической модификации для повышения продуктивности, снижения ингибирующего эффекта целевого продукта на метаболизм продуцента и получения повышенных титров молочной кислоты за короткое время ферментации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abedi E., Hashemi S.M.B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art // *Heliyon*. 2020. Vol. 6, no. 10. P. e04974. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04974.
2. Ojo A.O., de Smidt O. Lactic acid: a comprehensive review of production to purification // *Processes*. 2023. Vol. 11, no. 3. P. 688. DOI: 10.3390/pr11030688.
3. Kim J., Kim Y.-M., Lebaka V.R., Wee Y.-J. Lactic acid for green chemical industry: recent advances in and future prospects for production technology, recovery, and applications // *Fermentation*. 2022. Vol. 8, no. 11. P. 609. DOI: 10.3390/fermentation8110609.
4. Komesu A., Oliveira J.A.R.d., Martins L.H.d.S., Wolf Maciel M.R., Maciel Filho R. Lactic acid production to purification: a review // *BioResources*. 2017. Vol. 12, no. 2. P. 4364–4383. DOI: 10.15376/biores.12.2.Komesu.
5. Auras R., Harte B., Selke S. An overview of polylactides as packaging materials // *Macromolecular Bioscience*. 2004. Vol. 4, no. 9. P. 835–864. DOI: 10.1002/mabi.200400043.
6. Tian X., Liu X., Zhang Y., Chen Y., Hang H., Chu J., et al. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei* // *Bioresource Technology*. 2021. Vol. 323. P. 124549. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124549.
7. Kuo Y.-C., Yuan S.-F., Wang C.-A., Huang Y.-J., Guo G.-L., Hwang W.-S. Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain // *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 198. P. 651–657. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.071.
8. Romanova M.V., Dolbunova A.N., Epishkina Y.M., Evdokimova S.A., Kozlovskiy M.R., Kuznetsov A.Y., et al. A thermophilic L-lactic acid producer of high optical purity: isolation and identification // *Foods and Raw Materials*. 2024. Vol. 12, no. 1. P. 101–109. DOI: 10.21603/2308-4057-2024-1-591.
9. Okano K., Uematsu G., Hama S., Tanaka T., Noda H., Kondo A., et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus*

plantarum for direct L-lactic Acid production from raw corn starch // *Biotechnology Journal*. 2018. Vol. 13, no. 5. P. 1700517. DOI: 10.1002/biot.201700517.

10. Liu T., Xu X., Liu Y., Li J., Du G., Lv X., et al. Engineered microbial cell factories for sustainable production of L-lactic acid: a critical review // *Fermentation*. 2022. Vol. 8, no. 6. P. 279. DOI: 10.3390/fermentation8060279.

11. Kwan T.H., Vlysidis A., Wu Z., Hu Y., Koutinas A., Lin C.S.K. Lactic acid fermentation modelling of *Streptococcus thermophilus* YI-B1 and *Lactobacillus casei* Shirota using food waste derived media // *Biochemical Engineering Journal*. 2017. Vol. 127. P. 97–109. DOI: 10.1016/j.bej.2017.08.012.

12. Park I., Kim I., Kang K., Sohn H., Rhee I., Jin I., et al. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 // *Process Biochemistry*. 2010. Vol. 45, no. 4. P. 487–492. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.11.006.

13. Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. Vol. 70, no. 11. P. 5753–5798. DOI: 10.1099/ijsem.0.004475.

14. Konuray G., Erginkaya Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry // *Foods*. 2018. Vol. 7, no. 6. P. 92. DOI: 10.3390/foods7060092.

15. De Clerck E., Rodriguez-Diaz M., Forsyth G., Lebbe L., Logan N.A., De Vos P. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species // *Systematic and Applied Microbiology*. 2004. Vol. 27, no. 1. P. 50–60. DOI: 10.1078/0723-2020-00250.

16. Bischoff K.M., Liu S., Hughes S.R., Rich J.O. Fermentation of corn fiber hydrolysate to lactic acid by the moderate thermophile *Bacillus coagulans* // *Biotechnology Letters*. 2010. Vol. 32. P. 823–828. DOI: 10.1007/s10529-010-0222-z.

17. Michelson T., Kask K., Jõgi E., Talpsep E., Suitso I., Nurk A. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 // *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. Vol. 39, no. 4. P. 861–867. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.015.

18. Zhou X., Ye L., Wu J.C. Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97. P. 4309–4314. DOI: 10.1007/s00253-013-4710-7.

19. Ye L., Zhou X., Hudari M.S.B., Li Z., Wu J.C. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106 // *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 132. P. 38–44. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.011.

20. Maas R.H.W., Bakker R.R., Jansen M.L.A., Visser D., de Jong E., Eggink G., et al. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. Vol. 78. P. 751–758. DOI: 10.1007/s00253-008-1361-1.

21. Пат. № 2650669, Российская Федерация, С12N 1/19, С12P 7/56, С12R 1/85. Штамм *Schizosaccharomyces rombe* – продуцент молочной кислоты / Л.Н. Борщевская, Т.А. Гордеева, М.М. Вустин, М.А. Великая, А.Н. Калинина, С.П. Синеокий. Заявл. 21.12.2016; опубл. 16.04.2018. Бюл. № 11.

22. Суханова А.А., Ертилецкая Н.Л., Бояндин А.Н., Сырцов С.Н., Середа А.А., Прокопчук Ю.А. [и др.]. Исследование характеристик роста штаммов-продуцентов молочной кислоты с использованием глюкозного сиропа в качестве источника углерода // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. N 2. С. 245–254. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254. EDN: HUUHAE.

23. Zhang F., Liu J., Han X., Gao C., Ma C., Tao F., et al. Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LrFb) L-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain // *Engineering in Life Sciences*. 2020. Vol. 20, no. 12. P. 562–570. DOI: 10.1002/elsc.202000043.

24. Aragno M. Responses of microorganisms to temperature // *Physiological plant ecology I: responses to the physical environment* / eds O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler. Berlin – Heidelberg: Springer, 1981. P. 339–369. DOI: 10.1007/978-3-642-68090-8_12.

25. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics // *Biotechnology and Bioengineering*. 2020. Vol. 117, no. 11. P. 3545–3558. DOI: 10.1002/bit.27488.

26. Chen Y., Dong F., Wang Y. Systematic development and optimization of chemically defined medium supporting high cell density growth of *Bacillus coagulans* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100. P. 8121–8134. DOI: 10.1007/s00253-016-7644-z.

27. De Oliveira R.A., Schneider R., Rossell C.E.V., Filho R.M., Venus J. Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans* // *Bioresource Technology Reports*. 2019. Vol. 6. P. 26–31. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.02.003.

28. 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. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

29. Åkerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998. Vol. 49. P. 682–690. DOI: 10.1007/s002530051232.

30. Lund P.A., De Biase D., Liran O., Scheler O., Mira N.P., Cetecioglu Z., et al. Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 556140. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556140.

31. Juturu V., Wu J.C. Microbial production of lactic acid: the latest development // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016. Vol. 36, no. 6. P. 967–977. DOI: 10.3109/07388551.2015.1066305.

32. Guan N., Liu L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 104. P. 51–65. DOI: 10.1007/s00253-019-10226-1.

33. Tian W., Qin J., Lian C., Yao Q., Wang X. Identification of a major facilitator superfamily protein that is beneficial to L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* at low pH // BMC Microbiology. 2022. Vol. 22. P. 310. DOI: 10.1186/s12866-022-02736-2.

34. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics // Biotechnology and Bioengineering. 2020. Vol. 117, no. 11. P. 3545–3558. DOI: 10.1002/bit.27488.

REFERENCES

1. Abedi E., Hashemi S.M.B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*. 2020;6(10):e04974. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04974.

2. Ojo A.O., de Smidt O. Lactic acid: a comprehensive review of production to purification. *Processes*. 2023;11(3):688. DOI: 10.3390/pr11030688.

3. Kim J., Kim Y.-M., Lebaka V.R., Wee Y.-J. Lactic acid for green chemical industry: recent advances in and future prospects for production technology, recovery, and applications. *Fermentation*. 2022;8(11):609. DOI: 10.3390/fermentation8110609.

4. Komesu A., Oliveira J.A.R.d., Martins L.H.d.S., Wolf Maciel M.R., Maciel Filho R. Lactic acid production to purification: a review/ *BioResources*. 2017;12(2):4364-4383. DOI: 10.15376/biores.12.2.Komesu.

5. Auras R., Harte B., Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(9):835-864. DOI: 10.1002/mabi.200400043.

6. Tian X., Liu X., Zhang Y., Chen Y., Hang H., Chu J., et al. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *Bioresource Technology*. 2021;323:124549. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124549.

7. Kuo Y.-C., Yuan S.-F., Wang C.-A., Huang Y.-J., Guo G.-L., Hwang W.-S. Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain. *Bioresource Technology*. 2015;198:651-657. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.071.

8. Romanova M.V., Dolbunova A.N., Epishkina Y.M., Evdokimova S.A., Kozlovskiy M.R., Kuznetsov A.Y., et al. A thermophilic L-lactic acid producer of high optical purity: isolation and identification. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(1):101-109. DOI: 10.21603/2308-4057-2024-1-591.

9. Okano K., Uematsu G., Hama S., Tanaka T., Noda H., Kondo A., et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for direct L-lactic Acid production from raw corn starch. *Biotechnology Journal*. 2018;13(5):1700517. DOI: 10.1002/biot.201700517.

10. Liu T., Xu X., Liu Y., Li J., Du G., Lv X., et al. Engineered microbial cell factories for sustainable production of L-lactic acid: a critical review. *Fermentation*. 2022;8(6):279. DOI: 10.3390/fermentation8060279.

11. Kwan T.H., Vlysidis A., Wu Z., Hu Y., Koutinas A., Lin C.S.K. Lactic acid fermentation modelling of *Streptococcus thermophilus* YI-B1 and *Lactobacillus casei* Shirota using food waste derived media. *Biochemical Engineering Journal*. 2017;127:97-109. DOI: 10.1016/j.bej.2017.08.012.

12. Park I., Kim I., Kang K., Sohn H., Rhee I., Jin I., et al. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*. 2010;45(4):487-492. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.11.006.

13. Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed

as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(11):5753-5798. DOI: 10.1099/ijsem.0.004475.

14. Konuray G., Erginkaya Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. *Foods*. 2018;7(6):92. DOI: 10.3390/foods7060092.

15. De Clerck E., Rodriguez-Diaz M., Forsyth G., Lebbe L., Logan N.A., De Vos P. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology*. 2004;27(1):50-60. DOI: 10.1078/0723-2020-00250.

16. Bischoff K.M., Liu S., Hughes S.R., Rich J.O. Fermentation of corn fiber hydrolysate to lactic acid by the moderate thermophile *Bacillus coagulans*. *Biotechnology Letters*. 2010;32:823-828. DOI: 10.1007/s10529-010-0222-z.

17. Michelson T., Kask K., Jögi E., Talpsep E., Suitso I., Nurk A. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(4):861-867. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.015.

18. Zhou X., Ye L., Wu J.C. Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97:4309-4314. DOI: 10.1007/s00253-013-4710-7.

19. Ye L., Zhou X., Hudari M.S.B., Li Z., Wu J.C. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology*. 2013;132:38-44. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.011.

20. Maas R.H.W., Bakker R.R., Jansen M.L.A., Visser D., de Jong E., Eggink G., et al. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;78:751-758. DOI: 10.1007/s00253-008-1361-1.

21. Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Vustin M.M., Velikaya M.A., Kalinina A.N., Sineokij S.P. *Schizosaccharomyces pombe* strain – lactic acid producer. Patent RF, no. 2650669; 2018. (In Russian).

22. Sukhanova A.A., Ertiletskaya N.L., Boyandin A.N., Syrtsov S.N., Sereda A.A., Prokopchuk Yu.A., et al. Growth characteristics of lactic acid-producing strains using glucose syrup as a carbon source. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(2):245-254. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254. EDN: HIUHAE.

23. Zhang F., Liu J., Han X., Gao C., Ma C., Tao F., et al. Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LTrFb) L-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain. *Engineering in Life Sciences*. 2020;20(12):562-570. DOI: 10.1002/elsc.202000043.

24. Aragno M. Responses of microorganisms to temperature. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (eds). *Physiological plant ecology I: responses to the physical environment*. Berlin – Heidelberg: Springer; 1981, p. 339-369. DOI: 10.1007/978-3-642-68090-8_12.

25. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020;117(11):3545-3558. DOI: 10.1002/bit.27488.

26. Chen Y., Dong F., Wang Y. Systematic development and optimization of chemically defined medium supporting high cell density growth of *Bacillus coagulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100:8121-8134. DOI: 10.1007/s00253-016-7644-z.

27. De Oliveira R.A., Schneider R., Rossell C.E.V., Filho R.M., Venus J. Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. *Bioresource Technology Reports*. 2019;6:26-31. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.02.003.

28. Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013;31(6):877-902. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

29. Åkerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic

acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998. Vol. 49. P. 682–690. DOI: 10.1007/s002530051232.

30. Lund P.A., De Biase D., Liran O., Scheler O., Mira N.P., Cetecioglu Z., et al. Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:556140. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556140.

31. Juturu V., Wu J.C. Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(6):967-977. DOI: 10.3109/07388551.2015.1066305.

32. Guan N., Liu L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104:51-65. DOI: 10.1007/s00253-019-10226-1.

33. Tian W., Qin J., Lian C., Yao Q., Wang X. Identification of a major facilitator superfamily protein that is beneficial to L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* at low pH. *BMC Microbiology*. 2022;22:310. DOI: 10.1186/s12866-022-02736-2.

34. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020;117(11):3545-3558. DOI: 10.1002/bit.27488.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ертилецкая Наталья Леонидовна,

младший научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
✉ natalya.ertiletskaya@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2626-893X>

Суханова Анна Алексеевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
начальник отдела биоразлагаемых
полимерных материалов,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
shumilova.ann@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5830-1450>

Бояндин Анатолий Николаевич,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
boyandin@biopolymer.pro
<https://orcid.org/0000-0002-9190-2792>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalya L. Ertiletskaya,

Junior Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
✉ natalya.ertiletskaya@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2626-893X>

Anna A. Sukhanova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Head of the Department of Biodegradable
Polymer Materials,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
shumilova.ann@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5830-1450>

Anatoly N. Boyandin,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
boyandin@biopolymer.pro
<https://orcid.org/0000-0002-9190-2792>

Серда Анна Алексеевна,
младший научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
nensi.sereda@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-1891-4846>

Anna A. Sereda,
Junior Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
nensi.sereda@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-1891-4846>

Сырцов Сергей Николаевич,
научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
kaideil@list.ru
<https://orcid.org/0009-0001-6308-0031>

Sergei N. Syrtsov,
Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
kaideil@list.ru
<https://orcid.org/0009-0001-6308-0031>

Прокопчук Юлия Александровна,
лаборант-исследователь,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
batori_bloody@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0005-4653-0319>

Yulia A. Prokopchuk,
Laboratory Assistant,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
batori_bloody@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0005-4653-0319>

Вклад авторов

Н.Л. Ертилецкая – выполнение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, написание текста статьи.
А.А. Суханова – запрашивание финансирования, обсуждение результатов, написание текста статьи.
А.Н. Бояндин – развитие методологии, обсуждение результатов.
А.А. Серда – проведение экспериментов, обсуждение результатов.
С.Н. Сырцов – обсуждение результатов, подготовка текста статьи.
Ю.А. Прокопчук – проведение экспериментов, обработка полученных данных.

Contribution of the authors

Natalya L. Ertiletskaya – conducting experiments, data processing, results discussion, writing the text of manuscript.
Anna A. Sukhanova – funding acquisition, results discussion, writing the text of manuscript.
Anatoly N. Boyandin – methodology development, results discussion.
Anna A. Sereda – conducting experiments, results discussion.
Sergei N. Syrtsov – results discussion, preparing the text of manuscript.
Yulia A. Prokopchuk – conducting experiments, data processing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Информация о статье

Поступила в редакцию 24.05.2024.
Одобрена после рецензирования 26.06.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Information about the article

The article was submitted 24.05.2024.
Approved after reviewing 26.06.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.