

УДК 579.66:579.222.3

И. В. ГЕНЮШ, В. Ю. КУЗЬМИЦКАЯ, Н. А. БЕЛЯСОВА

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь,
e-mail: agniya_21@mail.ru*

Подобраны элективные условия, обеспечивающие эффективное выделение уксуснокислых бактерий. Из виноградных ягод, яблок, красной смородины и солода выделены 22 штамма ацетобактерий, включающих представителей родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*. Среди изолятов обнаружено 3 штамма, характеризующихся высоким выходом уксусной кислоты, в том числе штамм *Acetobacter* sp. Vin3.3, превосходящий по продуктивности коллекционный промышленный штамм *A. aceti* № 1.

Ключевые слова: уксусная кислота, ацетобактерии, натуральный уксус, переокисление, продуктивность, биотехнологический процесс.

I. HENIUSH, V. KUZMITSKAYA, N. BELYASOVA

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA PRODUCING ACETIC ACID

Byelorussian State Technological University, Minsk, Belarus, e-mail: agniya_21@mail.ru

Elective conditions were selected in order to ensure effective allocation of acetic acid bacteria. From grape berries, apples, red currant and malt were allocated 22 strain acetic acid bacteria, which include representatives of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. Among the isolates were found 3 strains with higher acetic acid production. Among them – the strain *Acetobacter* sp. Vin3.3, which is superior the collectible industrial strain *A. aceti* N 1 in productivity.

Keywords: acetic acid, acetic acid bacteria, natural vinegar, peroxidation, productivity, biotechnology process.

Введение. В настоящее время все большей популярностью у населения пользуются натуральные продукты. Не является исключением и пищевая уксус, который получают как биотехнологическим (натуральным), так и синтетическим (из химически синтезированной уксусной кислоты) способом. В натуральном уксусе за счет метаболических процессов уксуснокислых бактерий присутствует не только уксусная кислота, но и минеральные вещества, микроэлементы, органические кислоты, целый ряд ферментов и аминокислот, небольшое количество сложных эфиров, альдегидов и других органических соединений, которые и придают ему особый вкус и приятный аромат [1]. Синтетический уксус для пищевых целей выпускается, как правило, с добавлением многообразных ароматизаторов (идентичных натуральным и синтетическим). В некоторых зарубежных странах (США, Франция, Болгария) производство уксуса для пищевых целей из синтетической уксусной кислоты запрещено [2].

В то же время имеющийся при биотехнологическом производстве уксуса ряд проблем обусловлен физиолого-биохимическими особенностями продуцентов. В частности, глубинное культивирование бактерий рода *Acetobacter*, которые обладают высокой чувствительностью к содержанию молекулярного кислорода в ферментационной среде, связано с отмиранием клеток даже при кратковременном (10-секундном) снижении концентрации O_2 в культуральной жидкости [3]. В результате не удается обеспечить стабильно высокий уровень накопления уксусной кислоты в культуральной жидкости, что ведет к массовому развитию посторонних микроорганизмов.

Актуальной задачей является усовершенствование продуцентов уксусной кислоты и создание отечественной коллекции уксуснокислых бактерий.

Цель работы – выделение из объектов окружающей среды штаммов уксуснокислых бактерий с высокой скоростью синтеза уксусной кислоты, генетические детерминанты которых могут быть использованы для совершенствования промышленных продуцентов.

Материалы и методы исследования. Получение чистых культур уксуснокислых бактерий проводили с использованием общепринятых методов [4] в жидкой селективной среде выбранного состава и на плотных дифференциально-диагностических средах. Инкубирование и хранение бактерий осуществляли на полусинтетических плотных и жидких средах на основе минеральной среды Лойцянской [5] с использованием стандартных приемов [6], обеспечивая эффективное растворение молекулярного кислорода в среде. Определение содержания уксусной кислоты в 3-суточной культуральной жидкости проводили методом титрования 1н NaOH с фенолфталеином [7]. Идентификацию изолятов осуществляли по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам, учитывая характерные для ацетобактерий свойства [8].

Результаты и их обсуждение. Для увеличения эффективности выделения уксуснокислых бактерий из объектов окружающей среды использовали следующие селективные факторы:

жидкую синтетическую среду с этанолом в качестве источника углерода и энергии (4 %-ная концентрация, подавляющая рост большинства микроорганизмов, не способных к синтезу этанола); значение pH селективной среды 6,0 для ингибирования роста большинства бактерий, которые являются нейтралофильными;

введение в состав селективной среды 0,5 %-ной уксусной кислоты, которая, с одной стороны, служит ингибитором роста многих микроорганизмов, а с другой – способна использоваться бактериями рода *Acetobacter* в качестве источника углерода и энергии;

введение в среду нистатина (200 МЕ/мл) для подавления роста дрожжей;

инкубирование при 28 °С с интенсивной аэрацией (250 об/мин).

В подобранных селективных условиях развивались практически только уксуснокислые бактерии, лишь в нескольких экспериментах зарегистрирован рост устойчивых к нистатину дрожжей и актиномицетов.

Эффективность выделения уксуснокислых бактерий из различных источников

Образец	К-во исследованных образцов (эффективность выделения)	К-ко выделенных штаммов
Ягоды винограда: домашние сорта (Беларусь)	15 (73 %)	11
сорта из других стран (Турция, Южная Африка, Испания)	20 (38 %)	7
Яблоки (Беларусь)	10 (20 %)	2
Ягоды красной смородины (Беларусь)	4 (25 %)	1
Ячменный солод (ОАО «Пивзавод Оливария»)	1	1

Поскольку в окружающей среде уксуснокислые бактерии распространены довольно широко, требовалось создать условия для отбора наиболее эффективных продуцентов на плотных средах. Для этого в агаризованную синтетическую селективную среду вносили измельченный и прокаленный порошок CaCO₃. Установлено, что наиболее выраженные прозрачные ореолы вокруг колоний ацетобактерий (рис. 1) формируются на среде с 1 % CaCO₃ (испытывались концентрации 0,5; 1; 1,5; 2 %), что расходится с литературными данными [9, 10], согласно которым оптимальной концентрацией мела в среде для выявления кислотообразующих микроорганизмов является 0,5 %. Использование подобранной индикаторной среды позволило выявить среди изолятов наиболее активные продуценты уксусной кислоты, что подтверждено данными кислотно-основного титрования.

В период с мая 2014 г. по октябрь 2014 г. уксуснокислые бактерии выделяли из винограда разных сортов, произрастающих в Республике Беларусь и за ее пределами, клубники, смородины, крыжовника, малины, вишни, черешни, яблок, персиков, кокоса, манго, непастеризованного пива, пивного сусла, солода, вина домашнего, культуральной жидкости дрожжей, цветов гиби-

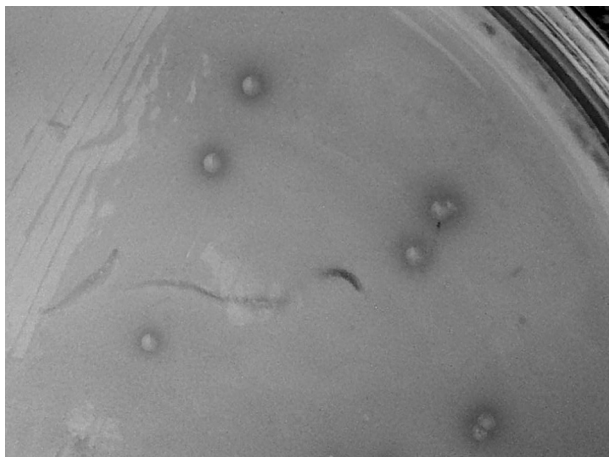


Рис. 1. Фото колоний уксуснокислых бактерий на агаризованной индикаторной среде с CaCO₃ (1 %)

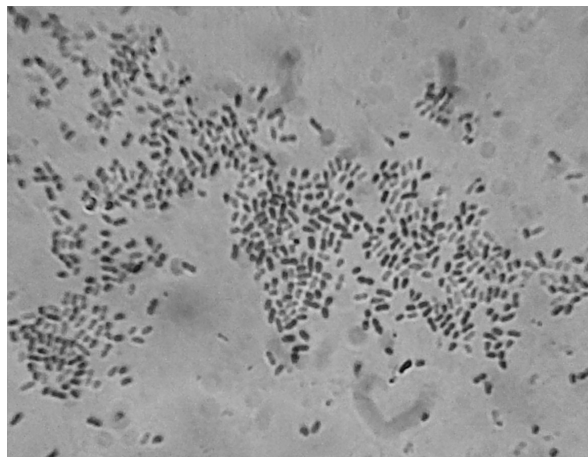


Рис. 2. Микрофотография бактерий штамма Vin3.3. ×1000

скуса, кефира и кислого молока. С использованием селективных условий и индикаторной меловой среды в виде чистых культур получили 22 штамма бактерий, способных с относительно высокой эффективностью продуцировать уксусную кислоту. В таблице приведены источники, из которых удалось изолировать уксуснокислые бактерии, и данные об эффективности получения изолятов.

Из таблицы видно, что наилучшим источником выделения является виноград: из 35 образцов винограда выделено 18 штаммов уксуснокислых бактерий. При этом эффективность получения изолятов уксуснокислых бактерий из отечественных сортов винограда выше, чем из импортного винограда, что, вероятно, связано с уменьшением числа микроорганизмов из-за использования консервантов при хранении и транспортировке винограда [11].

Все 22 изолята представлены граммотрицательными короткими палочками, в основном соединенными попарно (рис. 2), облигатными аэробами, не способными к сбраживанию углеводов, подвижными, активно окисляющими этанол до уксусной кислоты, оксидазоотрицательными, обладающими высокой каталазной активностью. Совокупность этих уникальных свойств дает возможность отнести все изоляты, способные к неполному окислению этанола бактериями, к ацетобактериям [8], не прибегая к молекулярно-генетическому анализу.

Важнейшим требованием к выделенным бактериям является высокая эффективность синтеза уксусной кислоты. На диаграмме (рис. 3) показаны различия в уровне продукции уксусной



Рис. 3. Продуктивность изолятов по уксусной кислоте

кислоты изолятами, выявленные в ходе кислотного-основного титрования. Согласно диаграмме, в подобранных нами лабораторных условиях продуктивность отобранных бактерий колеблется от 1,5 до 5,0 %. Наиболее активными продуцентами уксусной кислоты можно считать штаммы Vin1, Vin3.3, Sl. Один из изолятов (Vin3.3) превосходит по продуктивности коллекционный промышленный штамм *Acetobacter aceti* № 1.

Одной из производственных проблем при получении уксуса биотехнологическим способом является снижение концентрации уксусной кислоты в культуральной жидкости на определенных этапах технологического процесса за счет так называемого переокисления (окисления ацетата в CO₂). Причем из двух родов уксуснокислых бактерий, используемых в промышленности (*Acetobacter* и *Gluconobacter*), к переокислению способны представители только одного – *Acetobacter* [12].

Для первичной идентификации изолятов и выявления среди них представителей рода *Gluconobacter*, не осуществляющих «переокисление», использовали указанный признак и дифференциально-диагностическую среду с бромкрезоловым зеленым (0,002 %) [9]. На этой среде в течение первых двух суток инкубирования изначально синяя среда окрашивается в желтый цвет в зоне роста бактерий, что свидетельствует об изменении pH среды за счет выделения уксусной кислоты. Через 5 сут среда в зоне роста бактерий, способных окислять ацетат, окрашивается в синий цвет. В результате установлено, что из 22 изолятов уксуснокислых бактерий 19 способны доокислять уксусную кислоту до CO₂ и H₂O, а 3 (Vin6, Vin16, Vin19) – не способны, что дает основание отнести их к роду *Gluconobacter*. Эти бактерии характеризуются невысоким выходом ацетата (1,6–1,9 %), который, однако, соответствует уровню большинства природных изолятов остальных уксуснокислых бактерий (рис. 3). Данное обстоятельство позволяет надеяться на возможность улучшения этих продуцентов (*Gluconobacter* sp. Vin6, Vin16, Vin19) методами классической селекции, а также на востребованность их генетических детерминант для конструирования высокопродуктивных уксуснокислых бактерий, не «переокисляющих» основной продукт – уксусную кислоту.

Заключение. В результате проведенных исследований из 74 образцов выделено 22 штамма уксуснокислых бактерий. Наилучшими источниками этих бактерий являются виноградные ягоды, причем эффективность получения изолятов из отечественных сортов винограда составляет 73 %. Анализ физиолого-биохимических свойств выделенных 22 штаммов показал, что 19 (86 %) штаммов окисляют ацетат и их можно предварительно отнести к бактериям рода *Acetobacter*, а 3 (14 %) – к роду *Gluconobacter*. Определение продуктивности изолятов показало, что бактерии *Acetobacter* sp. Vin3.3 более активно синтезируют уксусную кислоту, чем коллекционные промышленные бактерии *A. aceti* № 1.

Список использованной литературы

1. Фунтиков, Д. В. Разработка процесса получения зернового биохимического уксуса из зрелой бражки / Д. В. Фунтиков, А. А. Ламберова, М. Э. Ламберова // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 3-й Всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых, Бийск, 28–30 апреля 2010 г.: в 2 ч. / Алт. гос. техн. ун-т, БТИ; редкол.: А. Н. Блазнов, М. Э. Ламберова, И. Н. Павлов. – Бийск, 2010. – Ч. 2. – С. 242–246.
2. Уксус [Электронный ресурс] // Википедия. – Режим доступа: <http://ru.m.wikipedia.org>. – Дата доступа: 01.10.2014.
3. Микробиологический синтез уксусной кислоты [Электронный ресурс] // Большая публичная библиотека. – Режим доступа: <http://www.pr-j.ru>. – Дата доступа: 01.10.2014.
4. Белясова, Н. А. Микробиология: лаб. практикум / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.
5. Муратова, Е. И. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учеб. пособие / Е. И. Муратова, О. В. Зюзина, О. Б. Шуняева. – Тамбов: Изд-во ТГТУ, 2007. – 80 с.
6. Методы общей бактериологии: в 3 т. / редкол.: Ф. Герхард (гл. ред.) [и др.]. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
7. Sharafi, S. M. Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods / S. M. Sharafi, I. Rasooli, K. B. Maal // Iran. J. of Microbiol. – 2010. – Vol. 2, N 1. – P. 38–45.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: in 5 vol. / ed.: G. M. Garrity (editor-in-chief) [et al.]. – Department of Microbiology and Molecular Genetics Michigan State University, 2005. – Vol. 2: The Proteobacteria, part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. – 1414 p.

9. *Fugelsang, K. C.* Wine microbiology. Practical applications and procedures / K. C. Fugelsang, C. G. Edwards. – New York: Springer Science + Business Media, 2007. – 408 p.

10. *Lu, S.-F.* A thermotolerant and high acetic-acid producing bacterium *Acetobacter* sp. 114-2 / S.-F. Lu, F.-L. Lee, H.-K. Chen // *J. of Appl. Microbiol.* – 1999. – Vol. 86, iss. 1. – P. 55–62.

11. Сбор, сортировка и упаковка винограда [Электронный ресурс] // Винный центр. – Режим доступа: <http://www.vinocenter.ru>. – Дата доступа: 01.10.2014.

12. *Du Toit, W. J.* The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking / W. J. Du Toit, I. S. Pretorius // *Annals of Microbiol.* – 2002. – Vol. 52, N 2. – P. 155–179.

Поступила в редакцию 20.02.2015