

LACTIC ACID BACTERIA AS PRODUCERS OF UREASE МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ ЯК ПРОДУЦЕНТИ УРЕАЗИ

V. Udymovych

В.М. УДИМОВИЧ

Національний університет харчових технологій

National University of Food Technologies

Biocement is considered as a substitute for traditional cement in the strengthening and waterproofing of soil or cracks in concrete. Microbially induced calcite precipitation (MICP) is the basis of biocementation. It occurs in the presence of dissolved calcium chloride, urea and suspended cells of urease-producing bacteria or urease enzyme and is accompanied by the production of a significant amount of ammonia, as well as ions of ammonium and hydroxide, which increase the pH of the environment to 8.5 - 9.0. More environmentally friendly is an alternative biocementation process that combines the precipitation of struvite and calcium carbonate at acidic pH and prevents the production of free ammonium and the release of ammonia into the atmosphere. To make this process, the use of urease, which would be active in the acidic environment and would be synthesized by biosafe microorganisms, is required.

*The search of acid urease producers was performed among lactic acid bacteria of lactic acid leaven, which are biosafe biological agents for large-scale use of biocementation. Lactic acid bacteria were grown on relatively cheap media based on skimmed milk powder or cabbage broth. According to the results of previous screening, possible producers of the enzyme urease among the studied samples of lactic acid bacteria may be *Lactobacillus reuteri* (preparation "BioGaia") and *Streptococcus thermophilus* (preparation "Optilact Plus"). Further verification of the properties of selected lactic acid bacteria showed the possibility of their use to obtain ureases that would be active in an environment with acidic pH. Synthesis of acid*

ureases by lactic acid bacteria Lactobacillus reuteri and Streptococcus thermophilus was conducted both on a medium made from skimmed milk powder or from cabbage broth.

Key words: *biocementation, acid urease, lactic acid bacteria, Lactobacillus reuteri, Streptococcus thermophilus.*

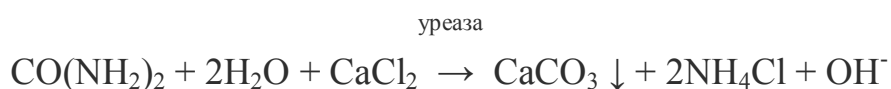
Біоцемент розглядається як замітник традиційного цементу при укріпленні та гідроізоляції ґрунту чи тріщин в бетоні. Мікробно-індуковане осадження кальцію (МІОК), що є основою біоцементації, котре відбувається за наявності розчиненого хлориду кальцію, сечовини та суспендованих клітин уреазопродукуючих бактерій чи ферменту уреазу і супроводжується утворенням значної кількості аміаку, а також іонів амонію та гідроксиду, що підвищує рН навколишнього середовища до 8,5 – 9,0. Більш екологічно безпечним є альтернативний процес біоцементації, який комбінує осадження струвіту та карбонату кальцію при кислому рН і дозволяє запобігти утворенню вільного амонію та вивільнення аміаку в атмосферу. Для здійснення цього процесу потрібно застосування уреазу, яка була б активною у кислому середовищі і синтезувалася біобезпечними мікроорганізмами.

Пошук продуцентів кислої уреазу проводили серед молочнокислих бактерій молочнокислих заквасок, які є біобезпечними біологічними агентами для широкомасштабного використання біоцементації. Молочнокислі бактерії вирощували на відносно дешевих середовищах на основі сухого знежиреного молока або капустяного бульйону. Згідно результатів попереднього скрінінгу можливими продуцентами фермента уреазу серед досліджених зразків препаратів молочнокислих бактерій можуть бути Lactobacillus reuteri (препарат «BioGaia») та Streptococcus thermophilus (препарат «Оптілакт Плюс»). Подальша перевірка властивостей відібраних молочнокислих бактерій показала можливість їх застосування для отримання уреаз, які були б активні у середовищі з кислим рН. Синтез кислих уреаз молочнокислими бактеріями

Lactobacillus reuteri та *Streptococcus thermophilus* відбувався як на середовищі, що було виготовлено на основі сухого знежиреного молока так і на основі капустяного бульйону.

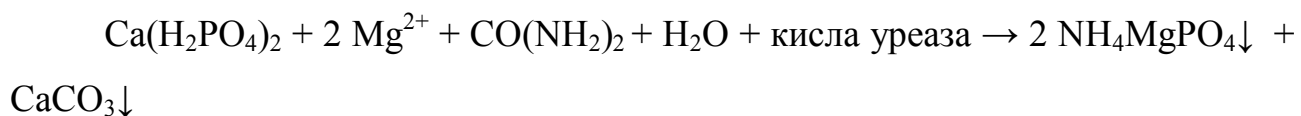
Ключові слова: біоцементация, кисла уреаз, молочнокислі бактерії, *Lactobacillus reuteri*, *Streptococcus thermophilus*.

Постановка проблеми. Найбільш відомим процесом біоцементации, який призводить до зменшення гідравлічної провідності (здатності пропускати воду) ґрунту та посилює міцність ґрунту, є так зване мікробно-індуковане осадження кальцію (МІОК), котре відбувається за наявності розчиненого хлориду кальцію, сечовини та суспендованих клітин уреазопродукуючих бактерій чи ферменту уреазу при підвищенні рН середовища до 8,5 – 9,0 (Ivanov and Stabnikov, 2017):



Недоліком цього процесу є утворення значної кількості аміаку, який виділяється в атмосферу, а також іонів амонію та гідроксиду, що можуть потрапляти до природних водоймищ (Ivanov et al., 2019).

Більш екологічно безпечним є альтернативний процес біоцементации, який комбінує осадження струвіту (NH_4MgPO_4) та карбонату кальцію при використанні потрійного суперфосфату та солі магнію, що дозволяє запобігти утворенню вільного амонію та вивільнення аміаку в атмосферу в процесі біоцементации:



Для здійснення цього процесу потрібно застосування кислої уреазу, тобто уреазу, яка була б активною у кислому середовищі. При цьому бажано вести пошук продуцентів такої уреазу серед біобезпечних мікроорганізмів, наприклад серед молочнокислих бактерій (Удимович та Стабніков, 2020).

Молочнокислі бактерії, які широко використовуються в приготуванні йогуртів та інших ферментованих молочних продуктів, використовують уреазну активність для нейтралізації кислот, що утворюються, а також для залучення діоксиду вуглецю і амонію в деякі біосинтетичні шляхи, що утворюється при гідролізі сечовини (Monnet et al., 2005).

Відомо, що *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (LoCascio et al., 2010), ротові бактерії *Streptococcus salivarius* (Chen and Burne, 2003) та деякі пробіотичні молочнокислі бактерії, такі як *Lactobacillus reuteri* (Wilson et al., 2014 року), мають уреазну активність. Уреаза, що синтезувалася *Lactobacillus reuteri*, була кислою уреазою, що показувала найвищу активність при рН 2 за температури 65°C (Kakimoto et al., 2014). Кисла уреаса також утворювалася *L. fermentum* і була активна в діапазоні рН 2,0 - 4,0 (Ough and Trioli, 1988). Таким чином, згідно з літературними даними деякі молочнокислі бактерії мають уреазну активність і уреаса зберігає активність при кислому рН (Таблиця 1).

Таблиця 1. Молочнокислі бактерії, що мають уреазну активність

Молочнокислі бактерії	Літературне джерело
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Kakimoto et al., 2014; Wilson et al., 2014
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	LoCascio et al., 2010
<i>Streptococcus salivarius</i>	Chen and Burne, 2003
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Arioli et al., 2007; 2009; Monnet et al., 2005; Zotta et al., 2008
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Ough and Trioli, 1988

Оскільки лактобактерії є ауксотрофними мікроорганізмами, при вирощуванні та накопиченні є потреба використовувати збагачені поживні середовища з різноманітним складом як природнього походження, так і синтетичного. Зазвичай при вирощуванні молочнокислих бактерій використовують такі поживні середовища як МРС або глюкозо-пептонне середовище. Висококоштовне глюкозо-пептонне середовище потребує

додавання макро- та мікроелементів і зазвичай використовується в лабораторних дослідженнях. Середовище МРС має всі необхідні сполуки для достатнього росту молочнокислих бактерій, але є дороговартісним, що не дає змоги його використовувати у промислових масштабах. Можливим поживним середовищем для вирощування молочнокислих бактерій може бути капустяний бульйон або ж середовище на основі сухого знежиреного молока.

Мета дослідження: видбір молочнокислих бактерій що мають уреазну активність при кислому рН при вирощуванні їх на живильному середовищі яке б могло знайти використання у промисловому масштабі.

Матеріали та методи

Мікроорганізми. Проводилась оцінка молочнокислих заквасок щодо наявності у них уреазної активності. В експерименті використовували кілька заквасок з наступним складом молочнокислих бактерій (можливі продуценти уреазиди відзначені жирним шрифтом) (Таблиця 2).

Таблиця 2. Молочнокислі закваски і їх мікробний склад

Молочнокисла закваска	Мікроорганізми, що входять до складу закваски
«Ротен» (Reuten, Medibase), Італія	<i>Lactobacillus reuteri LR92</i>
«BioGaia» (Farmasierra), Швеція.	<i>Lactobacillus reuteri DSM 17938</i>
Оптілакт Плюс (ТОВ «Фарма Старт»), Україна	<i>Bifidobacterium lactis, Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1, <i>Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum</i>
Фітнес ТМ «Milk Day» (Державне дослідне підприємство Інституту продовольчих ресурсів НААН України), Україна	<i>Bifidobacterium infantis, B. longum, Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus, L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> .
Імпровіт йогурт (Державне дослідне підприємство	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus.</i>

Інституту продовольчих ресурсів НААН України», Україна	
Біфідосан (ТОВ НВП «Аріадна»), Україна.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Йогурт (ТОВ НВП «Аріадна»), Україна	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>

Культивування молочнокислих бактерій. Сухе знежирене молоко розчиняли в дистильованій воді для приготування 8% розчину, розливали по 100 мл у плоскодонні колби ємністю 250 мл і стерилізували методом тиндалізації (Раскошная та ін., 2016). Сечовину, 20 г, розчиняли в 100 мл дистильованої води, і отриманий розчин стерилізували методом холодної фільтрації через мембранний фільтр з діаметром пор 0,25 мкм. Розчин сечовини вносили по 10 мл на 100 мл молока.

Подрібнену свіжу капусту, 200 г, вносили у 1 л водопровідної води, кип'ятили протягом 15 хв, фільтрували через ватно-марлевий фільтр, фільтрат розводили водопровідною водою у два рази. У фільтрат вносили, г/л: глюкоза, 20; пептон, 10; г карбонат кальцію, 10 (Тимченко та ін., 2010). Отримане живільне середовище нагрівали до кипіння, витримували 10 хв, розливали у колби об'ємом 250 мл і стерилізували протягом 20 хв при температурі 121±1°C .

Молочнокислі закваски, зокрема, Ротен (Р), Оптілакт (О), Фітнес (Ф), Імпровіт (І), Біфідосан (Б) і Йогурт (Й) вносили в колби (0,1 г в одну колбу) зі стерильним молоком і молоком, в яке був доданий розчин сечовини (С). Стерильне молоко (М) без внесення закваски слугувало контролем. Колби інкубували в термостаті за температури 37°C 96 годин зі стерильним відбором

проб для вимірювання рН через кожні 24 години. Досліди проводили в трьох повторях, показано середнє арифметичне.

Викладення основних результатів дослідження

Зміни рН в середовищах з молочнокислими заквасками показані на Рис. 1 - 3. Зміни рН в контролі (молоко без закваски) не відбувалося, залишаючись із середнім значенням 6,5, в той час як рН в молоці із заквасками знижувалося і досягало до 72 години інкубації в колбах з Ротен - 5,1, Оптілакт - 5,0, Фітнес - 3,7, Імпровіт - 3,4, Біфідосан - 3,4, і Йогурт - 4,0. Подальше деяке підвищення рН до 96 годинах було викликано, найімовірніше, частковим лізисом бактеріальних клітин. В колбах, в які було внесено розчин сечовини, значення рН до 72 години інкубації склали: з Ротен - 8,6, Оптілакт - 8,5, Фітнес - 4,6, Імпровіт - 5,1, Біфідосан - 6,3, і Йогурт - 7,2.

Згідно з отриманими даними досліджені закваски молочнокислих бактерій мали різну уреазну активність. рН не змінювалось у контрольних зразках молока із сечовиною, рН знижувалося у зразках молока із внесеними заквасками і підвищувалося у зразках молока із заквасками при додаванні сечовини.

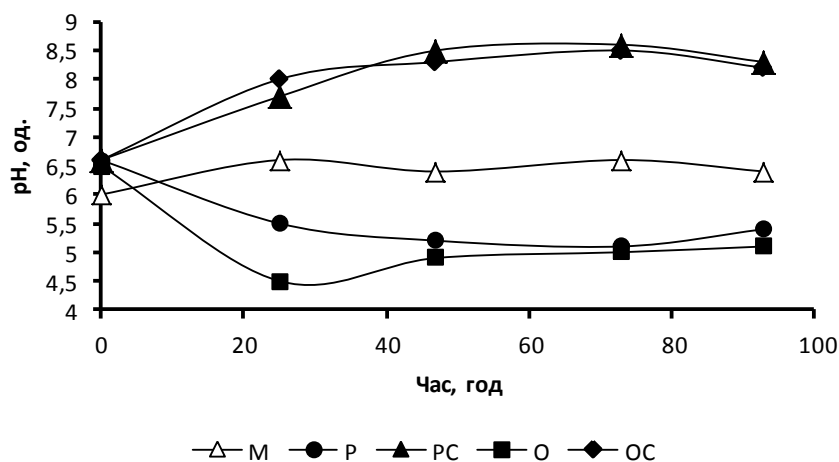


Рис. 1. Зміни рН у зразках: контроль (молоко, М, Δ); Ротен (Р, ●); Ротен+сечовина (МРС, ▲); Оптілакт (МО, ■); Оптілакт+сечовина (МОМ, ◆).

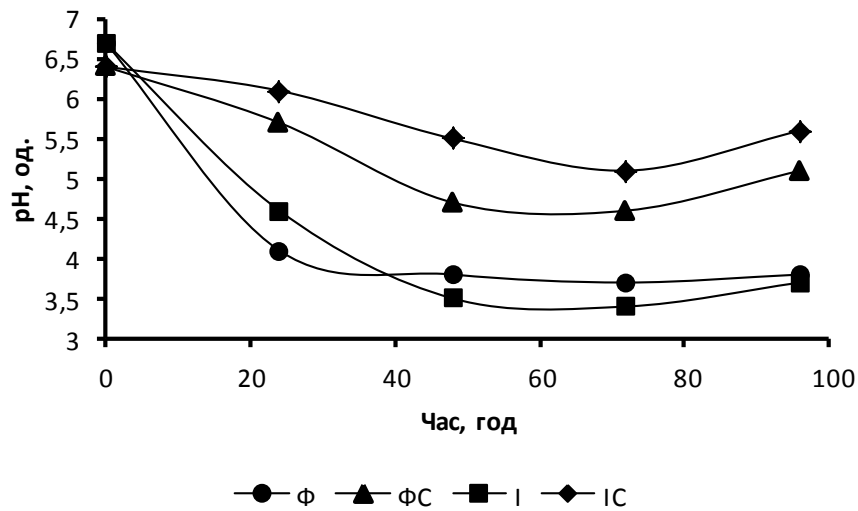


Рис. 2. Зміни рН у зразках: Фітнес (Ф, ●); Фітнес+сечовина (ФС, ▲); Імпровіт (І, ■); Імпровіт +сечовина (ІС, ◆).

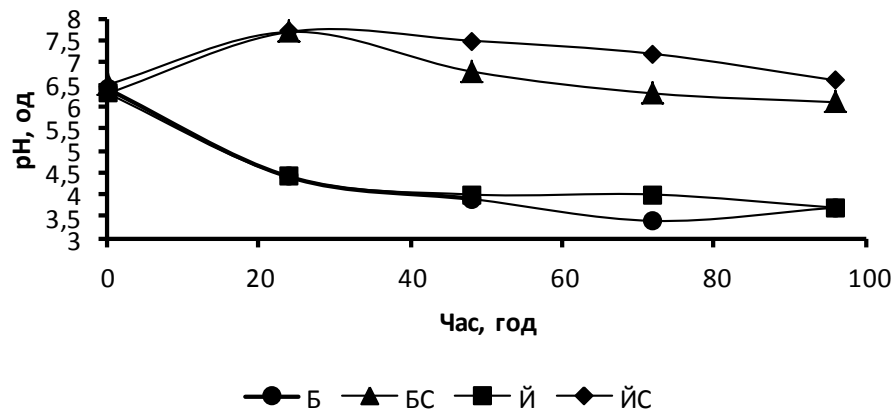


Рис. 3. Зміни рН у зразках: Біфідосан (Б, ●); Біфідосан +сечовина (БС, ▲); Йогурт (Й, ■); Йогурт +сечовина (ЙС, ◆).

Для подальших досліджень було обрано препарати «BioGaia» (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938) та «Оптілакт Плюс» (*Streptococcus thermophilus*). Метою дослідження була перевірка збереження активності уреазы цих молочнокислих бактерій в кислому середовищі. Для цього в зразки культуральну рідину молочнокислих бактерій на другу добу культивування вносили завчасно підготовлений розчин сечовини і продовжували вимірювання значення рН (Рис. 4).

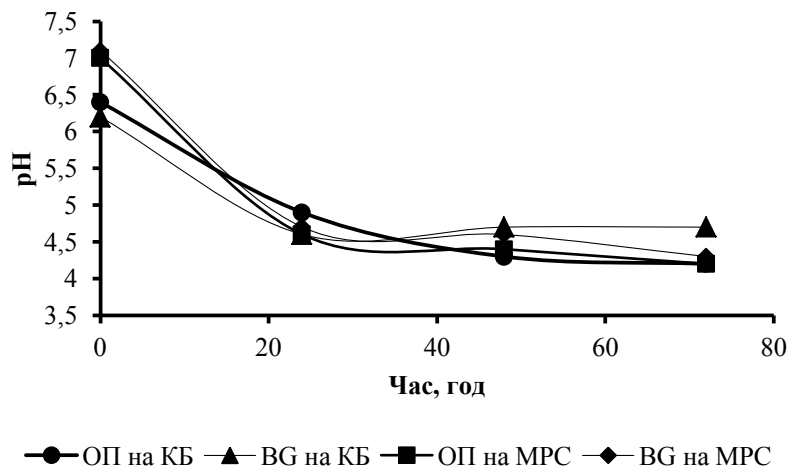


Рис. 4. Зміни рН у зразках: Оптілакс Плюс на капустиному бульйоні (ОП на КБ, ●); Оптілакс Плюс на МРС (ОП на МРС, ▲); BioGaia на капустиному бульйоні (BG на КБ, ■); BioGaia на МРС (BG на МРС, ◆).

Значення рН знижувалося і досягало до 72 години інкубації в колбах з Оптілакт Плюс (вирощування на капустиному бульйоні) – 4,2, Оптілакт Плюс (вирощування на МРС) - 4,2; BioGaia (вирощування на капустиному бульйоні) – 4,7; BioGaia (вирощування на МРС) – 4,3.

Висновки

Молочнокислі бактерії *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 та *Streptococcus thermophilus* продукують уреазу, які можуть бути активними в кислих умовах і можуть знайти використання для проведення біобезпечної біоцементації, яка комбінує осадження струвіту (NH_4MgPO_4) та карбонату кальцію при використанні потрійного суперфосфату та солі магнію та дозволяє запобігти утворенню вільного амонію та вивільнення аміаку в атмосферу.

Література

Раскошная Т.А., Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В. (2016). Разработка питательной среды и режимов культивирования *Lactobacillus reuteri* для получения бактериального концентрата. *Техника и технология пищевых производств*, 42(3), 56–62.

Тимченко Л.Д., Пенькова Н.И., Катунина Л.С. (2010). Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капустная среда для культивирования лактобактерий. *Вестник МГОУ*, 2, 51–55.

Удимович В.М., Стабніков В.П. (2020). *Молочнокислі бактерії як продуценти кислої уреазу*. Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції: матеріали ІХ Міжнародної науково-технічної конференції. Київ: НУХТ.

Arioli S., Monnet C., Guglielmetti S., Parini C., De Noni I., Hogenboom J., Halami P.M., Mora D. (2007). Aspartate biosynthesis is essential for the growth of *Streptococcus thermophilus* in milk, and aspartate availability modulates the level of urease activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5789–5796. DOI: 10.1128/AEM.00533-07.

Arioli S., Roncada P., Salzano A.M., Deriu F., Corona S., Guglielmetti S., Bonizzi L., Scaloni A., Mora D. (2009). The relevance of carbon dioxide metabolism in *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology*, 155(6), 1953–1965. DOI: 10.1099/mic.0.024737-0.

Chen Y.M., Burne R.A. (2003). Identification and characterization of the nickel transport system for urease biogenesis in *Streptococcus salivarius* 57.1. *Journal of Bacteriology*, 185(23), 6773–6779. DOI: 10.1128/jb.185.23.6773-6779.2003.

Ivanov V., Stabnikov V. (2017). *Construction Biotechnology: Biogeochemistry, Microbiology and Biotechnology of Construction Materials and Processes*. Green Energy and Technology, Springer, DOI:10.1007/978-981-10-1445-1.

Ivanov V., Stabnikov V., Stabnikova O., Kawasaki S. (2019). Environmental safety and biosafety in construction biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 26. DOI:10.1007/s11274-019-2598-9.

LoCascio R.G., Desai P., Sela D.A., Weimer B., Mills D.A. (2010). Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as revealed by comparative genomic hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7373–7381. DOI: 10.1128/AEM.00675-10.

Kakimoto S., Sumino Y., Akiyama S., Nakao Y. (1989). Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus reuteri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(4), 1119-1125. DOI: 10.1080/00021369.1989.10869440.

Monnet C., Mora D., Corrieu G. (2005). Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3376–3378. DOI: 10.1128/AEM.71.6.3376-3378.2005.

Wilson C.M., Loach D., Lawley B., Bell T., Sims I, O'Toole P.W., Zomer A., Tannock G.W. (2014). *Lactobacillus reuteri* 100-23 modulates urea hydrolysis in the murine stomach. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 6104–6113. DOI: 10.1128/AEM.01876-14.

Zotta T., Ricciardi A., Rossano R., Parente E. (2008). Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*, 25(1), 113–119. DOI: 10.1016/j.fm.2007.07.001.

Yang L., Wang S., Tian Y. (2008). Purification, properties, and application of a novel acid urease from *Enterobacter sp.* *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 303–313. DOI:10.1007/s12010-008-8159-6 .