

USE OF MULTICRITERIAL OPTIMIZATION OF THE GROWTH MEDIUM FOR ACCUMULATION OF BIOMASS OF LACTIC ACID BACTERIA

M. Khonkiv, S. Teterina

National University of Food Technologies

S. Danylenko, O. Potemka

Institute of Food Resources of NAAS

Key words:

*Multicriterial
optimization
Growth medium
Bacterial composition
Response surface
methodology
Lactic acid bacteria*

Article history:

Received 08.07.2020
Received in revised form
22.07.2020
Accepted 05.08.2020

Corresponding author:

M. Khonkiv

E-mail:

myroslavh85@gmail.com

ABSTRACT

The most important stage in the production of bacterial preparations based on lactic acid bacteria is to obtain the maximum yield of biomass in the minimum cultivation time. Cultivation of lactic acid bacteria is complicated by the nutritional needs of these microorganisms. For these bacteria requires a nutrient medium growth factors — amino acids, vitamins, minerals and others. Therefore, the issue of optimizing the conditions for culturing bacteria is relevant. The aim of this study was to establish the composition of the nutrient medium for growing the bacterial composition *Lactobacillus buchneri* 3806, *L. plantarum* 3796, *Enterococcus faecium* C-8-12. A commonly used medium for growing bacterial compositions based on lactic acid bacteria is MRS medium (Mann, Rogoza, Sharpe), which contains all the essential nutrients and growth factors for their development. In industrial conditions, the use of this medium is impractical due to its high cost. To optimize the composition of the nutrient medium the method rotatable central composition planning (RCKP) was used, that allowed to parse the growth of lactic acid bacteria according to six selected factors, such as concentration of glucose, corn and yeast extracts, peptone, acetate and sodium citrate. The optical density of the culture fluid was chosen as the criterion of optimality.

As a result, the nutrient medium of the following composition was optimized, g/l: base (protosubtilin-hydrolyzed milk with the addition of the following salts: monosubstituted potassium phosphate — 2 g/l; manganese sulfate 5-aqueous — 0.05 g/l; magnesium sulfate 7-aqueous — 0.2 g/l, twin-80 — 1.0); glucose — 19.7; yeast extract — 7.8; corn extract — 23.6; peptone — 9.1; sodium citrate — 6.6; and sodium acetate — 3.4. Increasing the bacterial composition allowed to obtain the maximum yield of biomass where the optical density was 2.01 units, which is almost twice the value obtained by culturing the same composition in MRS medium. The optimized medium is recommended for culturing the bacterial composition under industrial conditions.

DOI: 10.24263/2225-2924-2020-26-4-7

ВИКОРИСТАННЯ БАГАТОКРИТЕРІАЛЬНОЇ ОПТИМІЗАЦІЇ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

М. О. Хоньків, С. М. Тетеріна

Національний університет харчових технологій

С. Г. Даниленко, О. І. Потемська

Інститут продовольчих ресурсів НААН України

Найважливішою стадією у виробництві бактеріальних препаратів на основі молочнокислих бактерій є отримання максимального виходу біомаси за мінімальний термін культивування. Культивування молочнокислих бактерій ускладнено особливостями поживних потреб цих мікроорганізмів. Для цих бактерій необхідна наявність у поживному середовищі факторів росту — амінокислот, вітамінів, мікроелементів тощо, тому питання оптимізації умов культивування бактерій є актуальним.

*У статті проведено оптимізацію складу поживного середовища для вирощування бактеріальної композиції *Lactobacillus. buchneri* 3806, *L. plantarum* 3796, *Enterococcus faecium* C-8-12. Загальноживаним середовищем для вирощування бактеріальних композицій на основі молочнокислих бактерій є середовище МРС (Ман, Рогоза, Шарп), яке містить усі необхідні для їхнього розвитку поживні речовини й фактори росту. В промислових умовах застосування такого середовища є недоцільним через його високу вартість. Для оптимізації складу поживного середовища використовували метод ротатабельного центрально-композиційного планування, який дав змогу проаналізувати відгук росту молочнокислих бактерій залежно від концентрації глюкози, кукурудзяного і дріжджового екстрактів, пептону, ацетату та цитрату натрію. Критерієм оптимальності було обрано оптичну густину культуральної рідини.*

У результаті оптимізовано поживне середовище такого складу, г/л: основа (гідролізоване протосубтиліном молоко з додаванням таких солей: калій фосфорнокислий однозаміщений — 2 г/л; марганець сірчаноокислий 5-водний — 0,05 г/л; магній сірчаноокислий 7-водний — 0,2 г/л, твін-80 — 1,0); глюкоза — 19,7; дріжджовий екстракт — 7,8; кукурудзяний екстракт — 23,6; пептон — 9,1; цитрат натрію — 6,6; ацетат натрію — 3,4. Нарощування бактеріальної композиції дало змогу отримати максимальний вихід біомаси, за якого показник оптичної густини становив 2,01 од., що практично вдвічі більше, ніж значення, яке було одержано при культивуванні тієї ж композиції в середовищі МРС. Оптимізоване середовище рекомендовано для культивування бактеріальної композиції в промислових умовах.

Ключові слова: багатокритеріальна оптимізація, середовище росту, бактеріальна композиція, методологія поверхні відгуку, молочнокислі бактерії.

Постановка проблеми. Важливим етапом біотехнології бактеріальних препаратів на основі молочнокислих бактерій є забезпечення оптимальних умов і режимів для процесу культивування. Одним із визначальних параметрів, який впливає на накопичення біомаси, є відповідність складу поживного середовища

ростовим потребам бактерій. Велика частина субстрату в клітинах молочнокислих бактерій витрачається на синтез органічних кислот, тому найчастіше ріст бактерій першочергово лімітується спорідненістю з ним і його концентрацією. Для зменшення часу адаптації бактеріальних культур, вилучених з природного середовища, до нових умов у ході силосування існує необхідність використання поживних середовищ, наближених за хімічним складом до сировини. Основними джерелами вуглецю в рослинній сировині, що є доступними для силосної мікробіоти, є водорозчинні вуглеводи в клітинному соку — глюкоза і фруктоза. Існує потреба в ростових факторах та азотному живленні для молочнокислих бактерій від штаму до штаму, тому для забезпечення цих цілей використовують гідролізати білків м'яса, лактоальбуміну, казеїну та різних видів борошна [1; 2]. Також як джерела амінокислот, поліпептидів і вітамінів використовують дріжджовий і кукурудзяний екстракти [3; 4]. Останній з них є дешевою альтернативою азотного живлення — містить 1,2—2,0% амінного азоту в концентраті, що додатково може містити від 0,1—1,1% цукрів, 5—11,5% молочної кислоти. Те саме стосується і вітамінів та амінокислот, які знаходяться переважно в дріжджовому екстракті та дещо менше — в кукурудзяному.

При спільному культивуванні представників різних родів, видів і штамів молочнокислих бактерій необхідно враховувати всі особливості метаболізму кожної складової культури, що є дуже складним завданням. Щоб вирішити це завдання і підвищити результати до необхідної точності, раціонально використати математичні методи планування експерименту. Зокрема, є повідомлення, що за допомогою методу центрального композиційного плану було оптимізоване середовище для вирощування штаму *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei* В 4079 зі ступенем конверсії субстрату в біомасу і молочну кислоту — близько 100%. Оптимальні концентрації глюкози та інших джерел ростових факторів було визначено за найвищою зоною поверхні відгуку конверсії субстрату [4]. В іншому дослідженні для оцінки впливу компонентів поживного середовища перед використанням центрального композиційного плану використано метод Плакета-Бірмана, в результаті чого за допомогою такої гібридної методології на новому середовищі було накопичено біомаси штаму *L. rhamnosus* PEN на 1,9 г/л більше порівняно з концентрацією на МРС [5]. Більш складна оптимізація ферментаційного середовища для одержання екзополісахариду культурою *L. plantarum* наведена в праці індійських вчених [6], які застосували методи Плакета-Бірмана, штучних нейронних мереж і генетичних алгоритмів. Зокрема, такий підхід до оптимізації середовища підвищив вихід екзополісахариду на 4,45 г/л порівняно з вихідними характеристиками штаму. Серед інших ефективних підходів можна відмітити використання методів Бокса-Бенкена і масиву Тагуті, які характеризуються підвищенням виходу біомаси порівняно з початковим середовищем на 107%. Особливістю такого підходу є інтегрування двох методів на різних етапах оптимізації, тому збільшення біомаси досягається послідовним використанням методів [7].

У всіх проаналізованих експериментальних дослідженнях [4—7] використання методів математичного моделювання та статистичного аналізу надає можливість збільшити вихід кінцевого продукту порівняно з емпіричною методикою підбору індивідуальних середовищ, а також значно скоротити рівень затрачених ресурсів на досягнення бажаного результату.

Проте для застосування цих методів необхідно знайти модельні середовища, на основі яких здійснюється початковий пошук оптимального складу. Представники роду *Lactobacillus* не ростуть або ростуть дуже слабо на поживних середовищах з простими субстратами, тому в переважній більшості дослідники використовують багатокомпонентні середовища зі складними джерелами ростових факторів тваринного і рослинного походження [5; 10]. Так, загальнозживаним є середовище Man, Rogosa, Sharpe [8] у вигляді MRS-бульйону. Це середовище універсальне як для лабораторних, так і для великомасштабного вирощування лактобацил, лактококів, педіококів, ентерококів через достатнє забезпечення ростових потреб [9]. Проте, попри підвищення ростових характеристик, це середовище модифікують під індивідуальні фізіологічні потреби конкретних біологічних агентів. Крім того, середовище є доволі дороговартісним, а кожен виробник зацікавлений у зменшенні витрат за рахунок зниження концентрації поживних речовин до необхідного мінімуму або ж за рахунок використання дешевших альтернатив [10].

Метою дослідження є підбір та оптимізація складу середовища для виробництва бактеріальної композиції молочнокислих бактерій методом ротатабельного центрально-композиційного плану.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були два штами *L. buchneri* 3806 та *L. plantarum* 3796, ізольовані із силосу кукурудзи, та один штам *Enterococcus faecium* C-8-12, ізольований з фекалій кролика. Культури молочнокислих бактерій підтримували на середовищі MRS, між пересівами зберігали у відділі біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН України за температури $(4\pm 2)^\circ\text{C}$.

Для постановки дослідження з пошуку оптимального середовища використано методологію математичного планування експерименту. Для скорочення кількості дослідів для 6 факторів застосовано ротатабельний центрально-композиційний план. Критерієм оптимальності обрано оптичну густину культуральної рідини, що характеризує приріст біомаси.

Експериментальні дані одержували згідно із згенерованою матрицею дослідів. Кількість дослідів генерувалася за формулою (1) для центрального композиційного плану:

$$N = 2^{n-1} + 2n + N_0 \leq 3^n, \quad (1)$$

де 2^{n-1} — ядро плану експерименту; $2n$ — зіркові точки; N_0 — точки у центрі плану, n — кількість факторів.

Планування експерименту та обробка даних здійснювалася за допомогою програмного середовища для статистичного аналізу STATISTICA 12. У ході обробки результатів вираховувалися коефіцієнти рівняння полінома регресії та їх дисперсії. Перевірка адекватності одержаного відгуку здійснювалася за критерієм Фішера. Значення експериментальних даних, а також коефіцієнтів регресії вважалися статистично значимими, якщо $p \leq 0,05$.

Було досліджено 46 варіантів поживних середовищ, до яких вносили глюкозу (Гл) і кукурудзяний екстракт (КЕ) у кількості 10—20 г/л, казеїновий пептон (КП) — 5—10 г/л, дріжджовий екстракт (ДЕ) — 3—7 г/л, ацетат натрію (АН) — 2—4 г/л та цитрат натрію (ЦН) — 3—7 г/л.

Як основу середовища для накопичення біомаси мікроорганізмів використовували рідке поживне середовище гідролізованого протосубтиліном молока з

додаванням таких солей: калій фосфорнокислий однозаміщений — 2 г/л; марганець сірчаноокислий 5-водний — 0,05 г/л; магній сірчаноокислий 7-водний — 0,2 г/л, твін-80 — 1,0 мл/л. Контролем слугувало середовище МРС.

Культивування мікроорганізмів вели в періодичному режимі зі стабілізацією рН культуральної рідини в діапазоні 6,0—6,5 од. впродовж 14 год за оптимальної температури (36 ± 1)°C.

Інтенсивність розвитку культур у досліджуваних середовищах оцінювали за рівнем накопичення біомаси спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Unicо S 2100 (при довжині хвилі — 590 нм).

Результати і обговорення. Як фактор оптимізації було обрано 6 компонентів, за зміни яких могло б забезпечуватися збільшення рівня накопичення біомаси бактерій. Як джерело вуглецю було обрано глюкозу, що входить до складу середовища МРС і є основним вуглеводом клітинного соку кукурудзи. Як головне джерело азотного живлення, замість м'ясного екстракту, використовували концентрований кукурудзяний екстракт. Діапазони концентрацій для глюкози й кукурудзяного екстракту обрані на рівні 10—20 г/л. Для забезпечення всіх потреб метаболізму молочнокислих бактерій серед інших джерел азотного живлення та ростових факторів середовище доповнювали казеїновим пептоном у діапазоні концентрацій — 5—10 г/л та дріжджовим екстрактом — 3—7 г/л. Окрім того, використано ацетат і цитрат натрію в діапазонах концентрацій 2—4 г/л та 3—7 г/л відповідно. Відомо, що ацетати є інгібіторами для багатьох сторонніх мікроорганізмів, тоді як цитрати [11] — резервним джерелом енергії для молочнокислих бактерій. Ріст біомаси клітин оцінювали за оптичною густиною (*D*) культуральної рідини. Для одержання інформації про відгук оптичної густини залежно від концентрації складових поживного середовища обрано трирівневий центральний композиційний план експериментів. Для 6 факторів необхідно було одержати результати в 46 дослідах, варіанти комбінування яких наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Матриця експериментальних даних для поверхні відгуку

№	Значення змінних факторів						Відгук <i>Y</i>
	<i>X</i> ₁	<i>X</i> ₂	<i>X</i> ₃	<i>X</i> ₄	<i>X</i> ₅	<i>X</i> ₆	
1	2	3	4	5	6	7	8
1	10,00	3,00	10,00	5,00	3,00	2,00	1,09
2	10,00	3,00	10,00	5,00	7,00	4,00	1,12
3	10,00	3,00	10,00	10,00	3,00	4,00	1,19
4	10,00	3,00	10,00	10,00	7,00	2,00	1,21
5	10,00	3,00	20,00	5,00	3,00	4,00	1,54
6	10,00	3,00	20,00	5,00	7,00	2,00	1,58
7	10,00	3,00	20,00	10,00	3,00	2,00	1,60
8	10,00	3,00	20,00	10,00	7,00	4,00	1,62
9	10,00	7,00	10,00	5,00	3,00	4,00	1,28
10	10,00	7,00	10,00	5,00	7,00	2,00	1,30
11	10,00	7,00	10,00	10,00	3,00	2,00	1,32
12	10,00	7,00	10,00	10,00	7,00	4,00	1,36
13	10,00	7,00	20,00	5,00	3,00	2,00	1,66
14	10,00	7,00	20,00	5,00	7,00	4,00	1,69
15	10,00	7,00	20,00	10,00	3,00	4,00	1,70
16	10,00	7,00	20,00	10,00	7,00	2,00	1,73
17	20,00	3,00	10,00	5,00	3,00	4,00	1,45
18	20,00	3,00	10,00	5,00	7,00	2,00	1,47

1	2	3	4	5	6	7	8
19	20,00	3,00	10,00	10,00	3,00	2,00	1,49
20	20,00	3,00	10,00	10,00	7,00	4,00	1,52
21	20,00	3,00	20,00	5,00	3,00	2,00	1,78
22	20,00	3,00	20,00	5,00	7,00	4,00	1,84
23	20,00	3,00	20,00	10,00	3,00	4,00	1,82
24	20,00	3,00	20,00	10,00	7,00	2,00	1,88
25	20,00	7,00	10,00	5,00	3,00	2,00	1,59
26	20,00	7,00	10,00	5,00	7,00	4,00	1,61
27	20,00	7,00	10,00	10,00	3,00	4,00	1,64
28	20,00	7,00	10,00	10,00	7,00	2,00	1,67
29	20,00	7,00	20,00	5,00	3,00	4,00	1,91
30	20,00	7,00	20,00	5,00	7,00	2,00	1,93
31	20,00	7,00	20,00	10,00	3,00	2,00	1,92
32	20,00	7,00	20,00	10,00	7,00	4,00	1,92
33	3,11	5,00	15,00	7,50	5,00	3,00	0,95
34	26,89	5,00	15,00	7,50	5,00	3,00	1,80
35	15,00	0,24	15,00	7,50	5,00	3,00	1,69
36	15,00	9,76	15,00	7,50	5,00	3,00	1,75
37	15,00	5,00	3,11	7,50	5,00	3,00	1,11
38	15,00	5,00	26,89	7,50	5,00	3,00	1,94
39	15,00	5,00	15,00	1,55	5,00	3,00	1,52
40	15,00	5,00	15,00	13,45	5,00	3,00	1,82
41	15,00	5,00	15,00	7,50	0,24	3,00	1,59
42	15,00	5,00	15,00	7,50	9,76	3,00	1,87
43	15,00	5,00	15,00	7,50	5,00	0,62	1,60
44	15,00	5,00	15,00	7,50	5,00	5,38	1,86
45	15,00	5,00	15,00	7,50	5,00	3,00	1,78
46	15,00	5,00	15,00	7,50	5,00	3,00	1,79

Примітка: фактори: X_1 — концентрація глюкози; X_2 — концентрація дріжджового екстракту; X_3 — концентрація кукурудзяного екстракту; X_4 — концентрація казеїнового пептону; X_5 — концентрація цитрату натрію; X_6 — концентрація ацетату натрію. Зазначені значення концентрації компонентів вимірюються в грамах на літр середовища (г/л). Відгук: Y — значення оптичної густини.

Згідно з експериментальними значеннями оптичної густини, одержаними при культивуванні бактеріальної композиції, як математичну модель було обрано поліномом регресії другого порядку (2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^6 \beta_i X_i + \sum_{j=1}^6 \beta_{jj} X_j^2. \quad (2)$$

Перевірку адекватності впливу кожного фактора здійснювали з використанням дисперсійного аналізу. Значення критеріїв оцінки дисперсії одержаних результатів по кожному фактору наведені в табл. 2. Усі досліджені компоненти в їхніх діапазонах концентрацій є статистично значимими для впливу на оптичну густину, адже виконується умова $p \leq 0,05$.

Коефіцієнт детермінації, визначений для моделі, становить $R^2 = 0,96$, що свідчить про досить близьке наближення відгуку критерію оптимальності його реальним значенням. Саме тому запропоноване рівняння регресії є придатним для застосування в подальшій оптимізації.

Таблиця 2. Показники дисперсійного аналізу

№	Фактор		Критерії дисперсії				
			SS*	df*	MS*	F*	p*
1	Глюкоза	Л**	0,966952	1	0,966952	19339,04	0,004578
		К**	0,224623	1	0,224623	4492,45	0,009497
2	Дріжджовий екстракт	Л**	0,108987	1	0,108987	2179,75	0,013634
		К**	0,011667	1	0,011667	233,34	0,041616
3	Кукурудзяний екстракт	Л**	1,398910	1	1,398910	27978,19	0,003806
		К**	0,099127	1	0,099127	1982,54	0,014295
4	Казеїновий пептон	Л**	0,049451	1	0,049451	989,02	0,020236
		К**	0,025936	1	0,025936	518,73	0,027934
5	Цитрат натрію	Л**	0,029792	1	0,029792	595,84	0,026066
		К**	0,009488	1	0,009488	189,77	0,046133
6	Ацетат натрію	Л**	0,008545	1	0,008545	170,91	0,048602
		К**	0,009488	1	0,009488	189,77	0,046133
Відсутність придатності			0,129847	32	0,004058	81,15	0,087695
Чиста помилка			0,000050	1	0,000050		
Загальна сума квадратів (SS)			2,985783	45			

Примітка: * — показники дисперсії; SS — сума квадратів; df — ступені свободи; MS — середня сума квадратів; F — критерій Фішера; p — статистична значимість. ** — тип залежності: Л — лінійна, К — квадратична.

Коефіцієнти регресії, одержані для побудови поверхонь відгуку критерію оптимальності (D), наведені в табл. 3. Аналіз показує відповідність коефіцієнтів для заданої довірчої ймовірності $p = 95\%$.

Таблиця 3. Коефіцієнти регресії та їхня статистична значимість

Фактор	Компонент		Коефіцієнти регресії (β_i)	Чиста помилка	Критерій Стьюдента (t)	p
	Вільний коефіцієнт	β_0	-1,31229	0,037679	-34,8278	0,018274
X_1	Глюкоза	Л	0,12467	0,001430	87,1557	0,007304
		К	-0,00316	0,000047	-67,0258	0,009497
X_2	Дріжджовий екстракт	Л	0,07009	0,002995	23,4026	0,027186
		К	-0,00450	0,000295	-15,2756	0,041616
X_3	Кукурудзяний екстракт	Л	0,09891	0,001430	69,1475	0,009206
		К	-0,00210	0,000047	-44,5257	0,014295
X_4	Казеїновий пептон	Л	0,07793	0,002861	27,2414	0,023359
		К	-0,00429	0,000189	-22,7756	0,027934
X_5	Цитрат натрію	Л	0,05370	0,002995	17,9307	0,035468
		К	-0,00406	0,000295	-13,7756	0,046133
X_6	Ацетат натрію	Л	0,11145	0,007152	15,5831	0,040797
		К	-0,01623	0,001179	-13,7756	0,046133

Отже, загальне рівняння регресії з обрахованими коефіцієнтами має такий вигляд (3):

$$\begin{aligned}
 Y = & -1,31229 + 0,12467X_1 + 0,7009X_2 + 0,09891X_3 + 0,07793X_4 + \\
 & + 0,05370X_5 + 0,11145X_6 - 0,00316X_1^2 - 0,00450X_2^2 - 0,00210X_3^2 - \\
 & - 0,00429X_4^2 - 0,00406X_5^2 - 0,01623X_6^2.
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

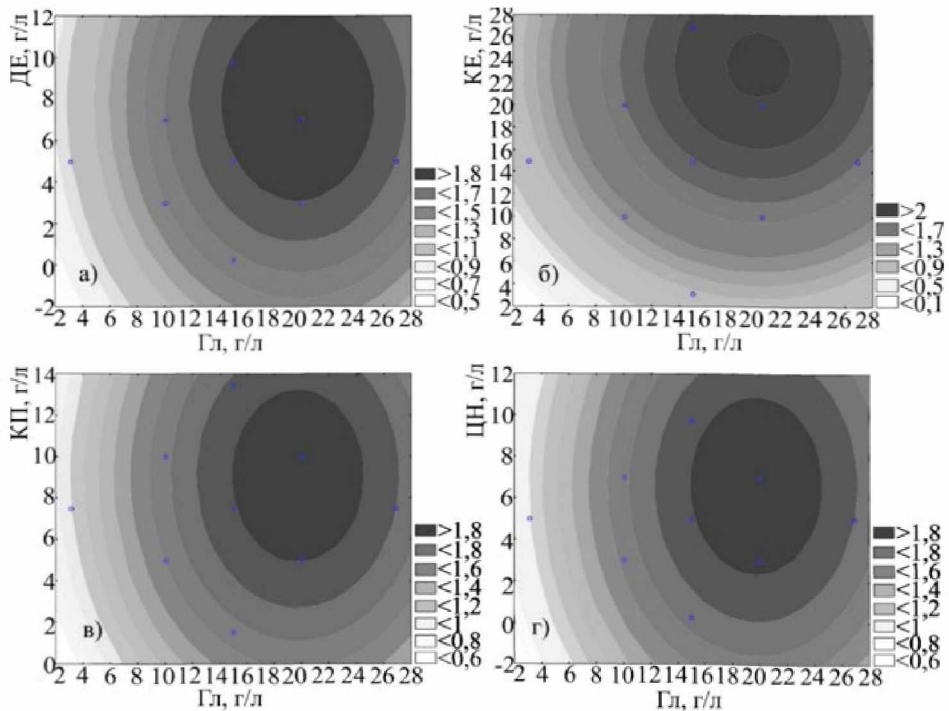
Поверхні відгуку являють собою тривимірну модель, тому для шести факторів було побудовано одразу 15 поверхонь відгуку, для яких приймали 2 змінних фактори при значенні константи для 4 інших. Проекції поверхонь відгуку оптичної густини наведено на рис. 1, 2.

Для встановлення значень концентрації аналізованих компонентів, за яких оптична густина буде мати максимальне значення, було знайдено екстремум функції відгуку в точці максимуму. Для вирішення цієї задачі розрахунки здійснено за допомогою програми STATISTICA 12 на основі побудованих поверхонь відгуку, результати яких наведено в табл. 4.

За розрахованих оптимальних концентрацій компонентів поживного середовища теоретичний показник оптичної густини досягає значення $D = 2,08$.

Таблиця 4. Критичні точки концентрацій компонентів у середовищі

Фактор	Концентрація компонента в середовищі		
	Мінімальні досліджені	Максимальні досліджені	Оптимальні концентрації
Глюкоза	3,11	26,89	19,73
Дріжджовий екстракт	0,24	9,76	7,79
Кукурудзяний екстракт	3,11	26,89	23,56
Пептон	1,55	13,45	9,07
Цитрат натрію	0,24	9,76	6,62
Ацетат натрію	0,62	5,38	3,43
Теоретичний D_{\max}			2,08



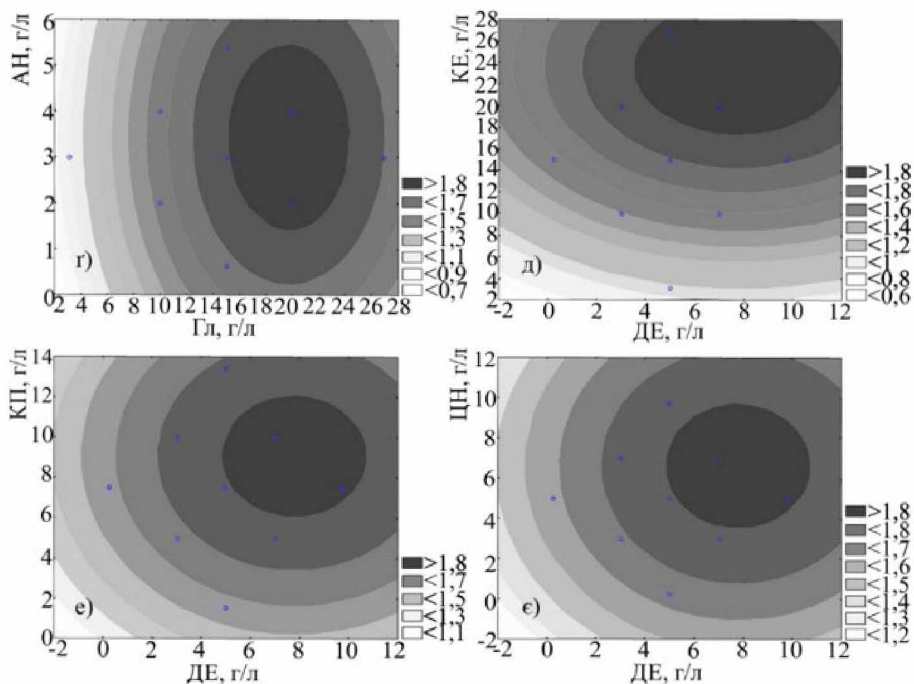
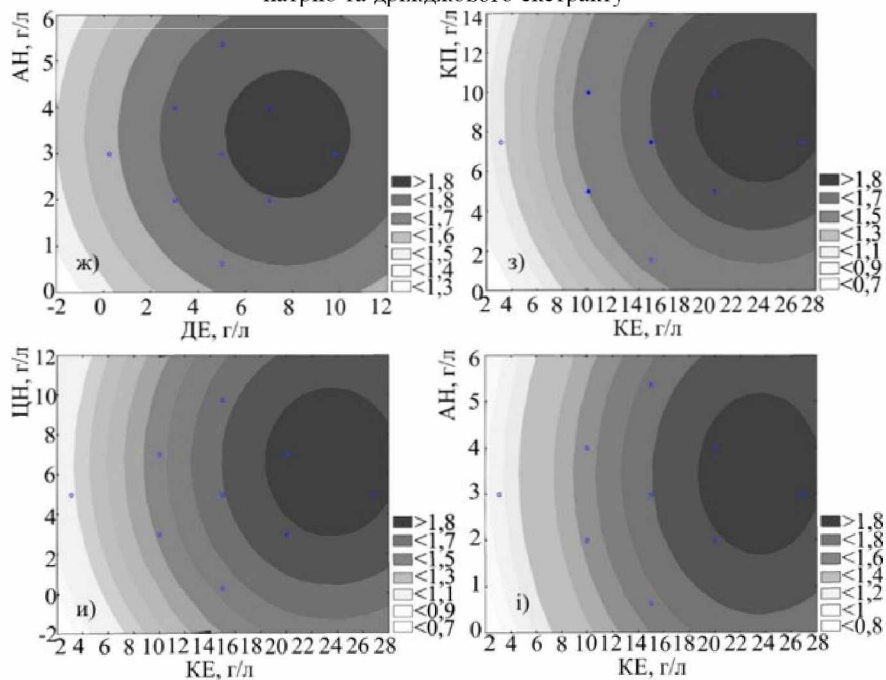


Рис. 1. Проекція поверхні відгуку оптичної густини (D , од) від концентрації компонентів поживного середовища (г/л): а) дріжджового екстракту та глюкози; б) кукурудзяного екстракту та глюкози; в) казеїнового пептону та глюкози; г) цитрату натрію та глюкози; г) апетату натрію та глюкози; д) кукурудзяного екстракту та дріжджового екстракту; е) казеїнового пептону та дріжджового екстракту; е) цитрату натрію та дріжджового екстракту



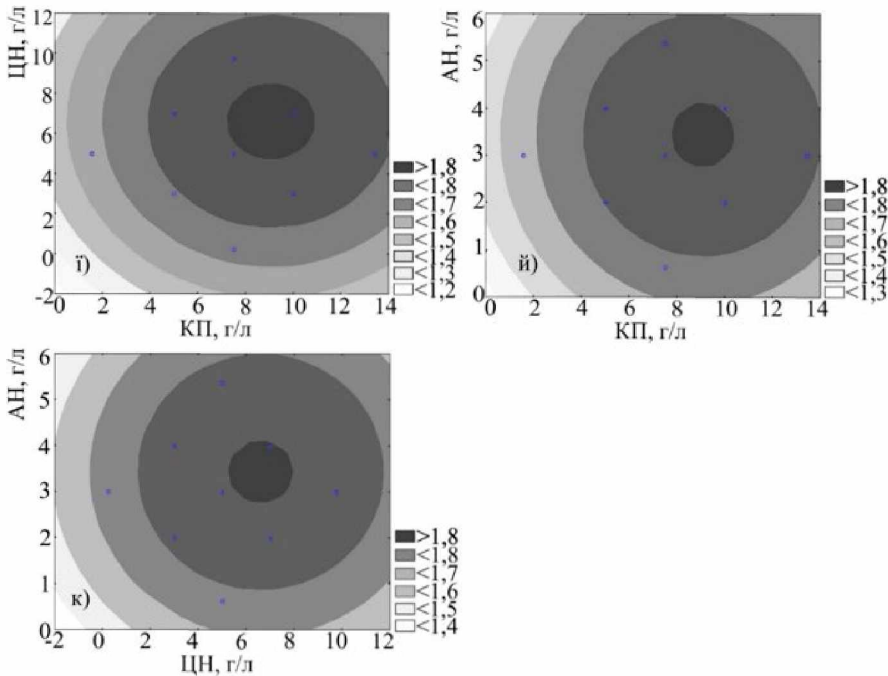


Рис. 2. Проекція поверхні відгуку оптичної густини (D , од) від концентрації компонентів поживного середовища (г/л): ж) ацетату натрію та дріжджового екстракту; з) казеїнового пептону та кукурудзяного екстракту; и) цитрату натрію та кукурудзяного екстракту; і) ацетату натрію та кукурудзяного екстракту; ї) цитрату натрію та казеїнового пептону; й) ацетату натрію та казеїнового пептону; к) ацетату натрію та цитрату натрію

Для перевірки теоретично одержаних результатів було проведено культивування бактеріальної композиції протягом 14 год за 37°C. До основи середовища додавали такі компоненти, г/л: глюкоза — 19,7; дріжджовий екстракт — 7,8; кукурудзяний екстракт — 23,6; казеїновий пептон — 9,1; цитрат натрію — 6,6; ацетат натрію — 3,4. Для контролю бактеріальну композицію культивували в МРС. У результаті перевірки значення оптичної густини для трьох реплік оптимізованого середовища одержане значення становило $2,01 \pm 0,01$, тоді як для середовища МРС значення оптичної густини було на рівні $1,08 \pm 0,02$.

Висновки

Для забезпечення ростових потреб триштамової бактеріальної композиції, до складу якої входять — *L. buchneri* 3806, *E. faecium* C-8-12 та *L. plantarum* 3796, теоретично розраховано й експериментально підтверджено склад поживного середовища для максимального накопичення біомаси, що може використовуватися як альтернатива для загально визнаного середовища МРС. Доведено, що в середовищі з оптимальними концентраціями компонентів можливе збільшення виходу біомаси бактерій майже вдвічі порівняно з МРС.

Використання ротатабельного центрально-композиційного плану дає змогу скоротити кількість дослідів та оптимізувати склад поживного середовища як для

монокультур, так і для їхніх композицій, що є перспективним при масштабуванні виробництва кінцевого продукту.

Література

1. Wegkamp A., Teusink B., De Vos W. M., Smid E. J. Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Letters in applied microbiology*. 2010. Vol. 50, № 1. P. 57—64. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02752.x.
2. Гизатова Н. В., Миронова И. В. Обоснование подбора видов микроорганизмов для обработки коллагенсодержащего сырья. *Инновационные технологии и технические средства для АПК*: Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. 15-17 ноября, 2016, Воронеж, Российская Федерация. С. 149—152.
3. Кудряшов В. Л., Лукин Н. Д., Оверченко М. Б., Погоржельская Н. С., Постникова В. Е., Соколова Е. Н., Смирнова И. А., Фурсова Н. А. Ультраконцентрат кукурузного экстракта-перспективный компонент питательных сред: технология производства и перспектива использования. Материалы VII Международного научно-практического симпозиума «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов». 09 апреля 2014, Москва, Российская Федерация. С. 379—385.
4. Деруаец А. С. Биологические основы совершенствования культивирования молочнокислых бактерий для разработки высокоэффективной технологии получения молочной кислоты. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева. Москва, 2020. 185 с.
5. Polak-Berecka M., Waśko A., Kordowska-Wiater M., Podleśny M., Targoński, Z., Kubik-Komar A. Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology. *Polish Journal of Microbiology*. 2010. Vol. 59, № 2. P. 113—118. doi: 10.33073/pjm-2010-017.
6. Desai K. M., Akolkar S. K., Badhe Y. P., Tambe S. S., Lele S. S. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques. *Process Biochemistry*. 2006. Vol. 41, № 8. P. 1842—1848. doi: 10.1016/j.procbio.2006.03.037.
7. Hwang C. F., Chang J. H., Hwang J. Y., Tsai C. C., Lin C. K., Tsen H. Y. Optimization of medium composition for improving biomass production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 using the Taguchi array design and the Box-Behnken method. *Biotechnology and bioprocess engineering*. 2012. Vol. 17, № 4. P. 827—834. doi: 10.1007/s12257-012-0007-4.
8. De Man J. C., Rogosa D. M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*. 1960. Vol. 23, № 1. P. 130—135. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
9. Chiang M. L., Chen H. C., Chen K. N., Lin Y. C., Lin Y. T., Chen M. J. Optimizing production of two potential probiotic *Lactobacilli* strains isolated from piglet feces as feed additives for weaned piglets. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2015. Vol. 28, № 8. P. 1163—1170. doi: 10.5713/ajas.14.0780.
10. Домотенко Л. В., Шепелин А. П., Детушев К. В. Сравнительные испытания Лактобакагара и MRS агары. *Человек и его здоровье*. 2014. № 4. С. 5—10.
11. Palles T., Beresford T., Condon S., Cogan T. M. (1998). Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 1998. Vol. 85, № 1. P.147—154. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00486.x.