**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Кафедра генетики**

СОКОЛЮК

Анна Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *ENTEROCOCCUS FAECALIS* БИМ В-1012**

Дипломная работа

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

доцент А.В. Лагодич

.

Допущена к защите

«\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2017г.

Зав. кафедрой генетики

доктор биологических наук, профессор Н.П.Максимова

Минск, 2017

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СИМВОЛОВ 4](#_Toc484013802)

[ВВЕДЕНИЕ 8](#_Toc484013803)

[ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10](#_Toc484013804)

[1.1. Молочная кислота 10](#_Toc484013805)

[1.1.1. Физическое и химическое строение и свойства 10](#_Toc484013806)

[1.1.2 Применение молочной кислоты 11](#_Toc484013807)

[1.1.3 Производство молочной кислоты 15](#_Toc484013808)

[1.2 Молочнокислые бактерии 15](#_Toc484013809)

[1.2.1 Использование молочнокислых бактерий 16](#_Toc484013810)

[1.2.2Свойства молочнокислых бактерий. 17](#_Toc484013811)

[1.2.2.1 Сырье для производства молочной кислоты. 18](#_Toc484013812)

[1.2.3 Технология производства молочной кислоты 18](#_Toc484013813)

[1.3 Технологии улучшения инкубации продуцентов молочной кислоты 22](#_Toc484013814)

[1.4 Основные подходы получения продуцентов молочной кислоты 24](#_Toc484013815)

[ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 27](#_Toc484013816)

[2.1 Объект исследования 27](#_Toc484013817)

[2.2 Среды и растворы 27](#_Toc484013818)

[2.3 Методы исследования 29](#_Toc484013819)

[2.3.1 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса 29](#_Toc484013820)

[2.3.2 Выделение плазмидной ДНК методом kit 30](#_Toc484013821)

[2.3.3 Протокол рестрикции 31](#_Toc484013822)

[2.3.4 Проверка эффективности применения методов на плазмидной ДНК в агарозном геме с помощью электрофореза 31](#_Toc484013823)

[2.3.5 Протокол подготовки вектора и вставки к лигированию. 31](#_Toc484013824)

[2.3.6 ПЦР. 32](#_Toc484013825)

[2.3.7 Трансформация клеток E.coli. 33](#_Toc484013826)

[ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 35](#_Toc484013827)

[3.1 Получение промежуточной конструкции пригодной для изучения функциональной активности лактатдегидрогиназ в гомо- и гетерологичном окружении. 35](#_Toc484013828)

[3.1.1 Подготовка вектора для клонирования продуктов амплификации 37](#_Toc484013829)

[3.1.2 Трансформация штаммов E. coli XL1-Blue и E. сoli DH5 alpha вектором pMTL21C со вставкой ldg1 37](#_Toc484013830)

[3.1.2.1 Рестрикция плазмиды pMTL21C по сайту SmaI 37](#_Toc484013831)

[3.1.2.2 Подготовка вектора pMTL21C и вставки LDG1 к лигированию 39](#_Toc484013832)

[3.2 Биоинформационный анализ последовательностей генов ldg1и ldg2 40](#_Toc484013833)

[3.2.1 Вторичная структура лактатдегидрогеназ 1 и 2 41](#_Toc484013834)

[3.2.2 Четвертичная структура белков и их доменная организация 42](#_Toc484013835)

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 46](#_Toc484013836)

[СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 47](#_Toc484013837)

# ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СИМВОЛОВ

|  |  |
| --- | --- |
| АДФ | аденозиндифосфат |
| АТФ | аденозинтрифосфат |
| Мкл | микролитр |
| НАД | никотинамидаденидинуклеотид |
| Нг | нанограммы |
| пм | пика моль |
| п. о. | пары оснований |
| т. п. н. | тысяч пар нуклеотидов |
| ldhD(LDG) | ген лактатдегидрогеназы Д |
| ldh L(LDG) | ген лактатдегидрогеназы Л |
| LDG1 | лактатдегтдрогеназа 1-го типа |
| LDG2 | лактатдегтдрогеназа 2-го типа |

**РЕФЕРАТ**

Дипломная работа 49 с, 12 рисунков, 11 таблиц, 33 источников

Ключевые слова: Молочная кислота, лактатдегидрогеназа, *Enterococcus faecalis,* lactobacillus, рестрикция, трансформация, структура, домен, белок

Объекты исследования: *Enterococcus faecalis* БИМ B-1012

Целью работы является получение молекулярно-генетической модели организации и функционирования лактатдегидрогеназ штамма *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012, пригодной для отработки приемов повышения его биотехнологического потенциала как продуцента молочной кислоты

Методы исследования: микробиологические (проводилось культивирование целевых штаммов), молекулярно-генетические (производилось выделение и очистка ДНК, трансформация, ресктрикционный и электрофоретический анализы, ПЦР, клонирование), биоинформационные (моделировались пространственные структуры белков, определялись соответствующие им свойства).

В ходе работы были получены первичные нуклеотидные последовательности для генов *ldg1* и *ldg2*, анализ которых позволил подобрать праймеры для амплификации генов лактатдегидрогеназ первого и второго типов штамма *Enterococcus faecalis* БИМ И-1012.

Была получена генетическая конструкция на основе вектора pMTL21C, содержащая ген ldg1, пригодная для изучения функциональной активности лактатдегидрогеназ первого типа.

Осуществлен анализ последовательности генов *ldg1* и  *ldg2* и детерминируемых ими продуктов штамма *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012. При сравнении полученных последовательностей видно, что белки LDG1и LDG2сходны в общей организации, в то время как гены *ldg1* и *ldg2* имеют низкую степень гомологии нуклеотидных последовательностей ‑ 44 % Было выяснено, что по пространственной структуре белки LDG1 и LDG2 представляют собой гомотетрамеры и имеют цитоплазматическую локализацию в клетке.

**РЭФЕРАТ**

Дыпломная праца 49 с, 12 малюнкаў, 11 табліц, 33 крыніцы

Ключавыя словы: МАЛОЧНАЯ КІСЛАТА, ЛАКТАТДЭГІДРАГЕНАЗА, ENTEROCOCCUS FAECALIS, LACTOBACILLUS, РЭСТРЫКЦЫЯ, ТРАНСФАРМАЦЫЯ, СТРУКТУРА, ДАМЕН, БЯЛОК

Аб'екты даследавання: *Enterococcus faecalis* БІМ B-1012

Мэтай працы з'яўляецца атрыманне малекулярна-генетычнай мадэлі арганізацыі і функцыянавання лактатдегидрогеназ штаму *Enterococcus faecalis* БІМ B-1012, прыдатнай для адпрацоўкі прыёмаў павышэння яго біятэхналагічнага патэнцыялу як прадуцэнтаў малочнай кіслаты

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (праводзілася культываванне мэтавых штамаў), малекулярна-генетычныя (адбывалася выдзяленне і ачыстка ДНК, трансфармацыя, рэстрыцыйны і электрафарэтычны аналіз, ПЦР, кланаванне), біяінфармацыйныя (мадэляваліся прасторавыя структуры бялкоў, вызначаліся адпаведныя ім якасці).

На працягу даследавання былі атрыманыя першасныя нуклеатыдныя паслядоўнасці для генаў *ldg1* і *ldg2*, аналіз якіх дазволіў падабраць праймеры для ампліфікацыі генаў лактатдэгідрагеназ першага і другога тыпаў штама *Enterococcus faecalis* БІМ B-1012

Была атрымана генетычная канструкцыя на аснове вектара pMTL21C, якая змяшчае ген ldg1, прыгодная для вывучэння функцыянальнай актыўнасці лактатдэгідрагеназ першага тыпу.

Праведзены аналіз паслядоўнасці генаў *ldg1* i *ldg2* і дэтэрмiнуемых імі прадуктаў штаму *Enterococcus faecalis* БІМ B-1012. Пры параўнанні атрыманых паслядоўнасцяй бачна, што бялкі LDG1 і LDG2 падобныя ў агульнай арганізацыі, у той час як ступень падабенства нуклеатыдных паслядоўнасцяў генаў *ldg*1 і *ldg*2 складае ўсяго 44 %.

Было высветлена, што па прасторавай сруктуры бялкі LDG1 і LDG2 уяўляюць сабой гоматэтрамеры і маюць цытаплазматычную лакалізацыю ў клетцы.

**ABSTRACT**

The diploma work: Number of pages – 49, figures – 12, tables –11, sources used – 33.

Keywords: lactic acid, lactate dehydrogenase, Enterococcus faecalis, lactobacillus, restriction, TRANSFORMATION, structure, domain. PROTEIN

Research object: *Enterococcus faecalis* BIM B-1012.

Aim of research: To obtain the molecular-genetic model of organization and functioning of lactate dehydrogenase produced by the strain *Enterococcus faecalis* BIM B-1012 suitable for developing the methods resulting in enhancing of the biotechnological potential of the strain as a producer of lactic acid.

Research methods: microbiology (cultivation of the target strains); molecular genetic (isolation and purification of DNA; transformation; restriction and electrophoretic analysis; PCR, molecular cloning), bioinformatic analysis (modeling the spatial structure of proteins, determining the properties).

During the work, primary nucleotide sequences for *ldg1* and *ldg2* genes were obtained, the analysis of which allowed selecting primers for amplification of lactate dehydrogenase genes of the first and second types of strain *Enterococcus faecalis* BIM I-1012.

A genetic construct based on the pMTL21C vector containing the ldg1 gene, suitable for studying the functional activity of lactate dehydrogenases of the first type, was obtained.

The analysis of the sequence of the *ldg1* and *ldg2* genes and the products of the strain *Enterococcus faecalis* BIM B-1012 determined by them was carried out.

The comparing of these sequences showed that the LDG1 and LDG2 proteins were similar in the overall organization, whereas the *ldg*1 and *ldg*2 genes organization showed only 44% similarity in the amino acid composition. While scrutinizing the LDG1 LDG2 proteins the homotetrameric spatial structure and cytoplasmic cell localization of the proteins were detected.

# ВВЕДЕНИЕ

Молочная кислота достаточно широко распространена в природе и свое тривиальное название получила в связи с тем, что была выделена из прокисшего молока. Как правило, в природе она образуется в ходе молочнокислого брожения различных сахаров, появляясь в прокисшем молоке, вине и пиве. Образуется молочная кислота и в живых организмах, например у человека она присутствует в мышцах, являясь продуктом обмена в результате анаэробного гликолиза. Неоспоримой пользой лактата для живых организмов является его использование в виде источника энергии, а так же сырья для последующего синтеза гликогена и глюкозы. В настоящее время результаты исследований мышечной системы человека доказывают пользу молочной кислоты для роста мышц, в связи с тем, что она вызывает расширение сосудов, что приводит к улучшению кровотока, позволяя крови лучше транспортировать кислород к мышцам.

Свое применение молочная кислота находит в большинстве сфер жизни человека. Её используют и в пищевой, и в кожевенной, и в легкой промышленностях, так же лактат занимает значимое место по применению как в медицине, так и в ветеринарии.

По своему строению молочная кислота относится к простейшим гидроксикислотам, имея асимметричный атом углерода, который обеспечивает данному соединению наличие двух форм оптических изомеров – D(или R) и L(или S). D-изомер, в отличии от L-формы молочной кислоты, организмом не усваивается. В организме человека и животных вырабатывается именно L-молочная кислота. Так же она является безопасной добавкой в пище и используется при создании медикаментов, в связи с чем L-молочная кислота представляет большой интерес для медицинской промышленности. Благодаря широкому применению молочной кислоты в различных отраслях жизни человека, вопрос о создании её продуцентов, продуцирующих оптически чистую молочную кислоты, является весьма актуальным.

Молочная кислота может быть получена двумя способами: физико-химическим и биотехнологической ферментацией. Биотехнологическая ферментация осуществляется с привлечением инструментов генной инженерии. Подобный способ получения молочной кислоты является наиболее интересным, в связи с экологическими проблемами и ограниченностью нефтехимического сырья, необходимого для получения лактата физико-химическим способом. Рацемическую смесь D и L молочной кислоты получаются путем химического синтеза, но вот оптически чистую L- молочную кислоту или D- молочную кислоту можно получить путем микробной ферментации, использую как природных продуцентов молочной кислоты, так и генетически измененных организмов, обладающих увеличенным выходом одной из кислот. Природными продуцентами молочной кислоты являются такие виды бактерий как: *Streptococcus faecalis, Lactobacillus casei, Streptococcus lactis, Streptococcus faecium, Leuconostoc mesenteroides, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus lactis, Enterococcus faecalis*. Также в качестве продуцентов выступают дрожжи. [22].

Целью работы является получение молекулярно-генетической модели организации и функционирования лактатдегидрогеназ штамма *E.faecalis* БИМ В-1012, пригодной для отработки приемов повышения его биотехнологического потенциала как продуцента молочной кислоты

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1)Получить первичную нуклеотидную последовательность для генов LDG1 и LDG2.

2) Получить генетическую конструкцию на основе вектора pMTL21C, содержащую ген *ldg1* пригодную для изучения функциональной активности лактатдегидрогеназы первого типа.

3)Предсказать пространственную структуру белка LDG1 и LDG2.

4)На основе структуры белков прогнозировать их свойства.

# ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## Молочная кислота

### Физическое и химическое строение и свойства

Молочная кислота впервые была выделенная в 1780г шведским ученым-химиком Шееле, и получила свое название благодаря тому, что найдена была в прокисшем молоке. В последующем выяснилось, что точно такая же кислота образуется в процессе закисания капусты и других различных овощей и плодов, а также при созревании сыра. Чуть позже, в 1832 г. благодаря Либиху, выяснилось, что кислота с таким же строением содержится и в мышечной ткани человека и животных. Ученый химик выделил из мышц цинковую соль молочной кислоты и назвал её мясомолочной. В дальнейшем выяснилось, что молочная кислота, образующаяся в мышцах, появляется благодаря расщеплению запасного крахмала или гликогена. В мышцах человека и животных во время работы количество молочной кислоты возрастает, и за время отдыха одна её часть превращается в гликоген, а другая окисляется до воды и углекислого газа. Позже выяснилось, что молочная кислота образовавшаяся в ходе брожения и образующаяся в процессе мышечной работы являются одинаковыми.[1]

Лактат, или молочная кислота, по физическим характеристикам является прозрачной вязкой жидкостью с кислым вкусом и характерным кислотным запахом. Он прекрасно растворяется в глицерине, спирте и воде при температуре 20°C. По номенклатуре ИЮПАК(IUPAC) молочная кислота принадлежит к алифатическим (содержащим гидрокси-группу) оксикислотам (гидроксикислотам), так как содержит в своем составе и спиртовой гидроксил, и карбоксильную группу. Его химическая формула СН3СН(ОН)СООН, а «молочная кислота» лишь тривиальное название. С точки зрения номенклатуры её правильное название 2-гидроксипропановая кислота. С точки зрения химического строения, каждая молекула молочной кислоты содержит асимметрически замещенный атом углерода, благодаря наличию которого она может существовать в виде двух оптически активных(энантиомерных) формах: L молочная кислота при температуре 25-26°С и D молочная кислота при температурной плотности 25-26°С как показано на рисунке 1. Левовращающая молочная кислота относится к D-ряду (R-конфигурации), правовращающая к L-ряду (S-конфигурации). [2]

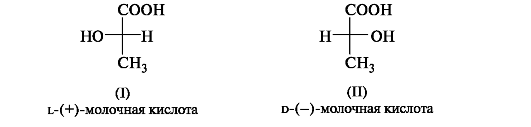


Рисунок 1.1 – Структурная формула молочной кислоты

Результатом молочнокислого брожения является образование рацемической смеси оптически неактивной молочной кислоты. Внешне лактат является бесцветными гигроскопическими кристаллами, которые прекрасно растворяются в воду. Однако получить такую безводную молочную кислоту довольно сложно, потому что дальнейшее удаление из образовавшегося раствора воды сопровождается образованием лактида.

В повседневной жизни такая молочная кислота образовывается при скисании молока, квашенной капусты, в разнообразных соленьях, выполняя функцию консерванта, так как способна препятствовать развитию гнилостных бактерий.

Как правило правовращающая форма D молочной кислоты образуется в результате молочнокислого брожения. Левовращающая L –форма образуется в результате расщепления углеводов. Особенно много её накапливается в мышцах при больших физических нагрузках. [3]

При нагревании от молочной кислоты легко отделяется вода, образуя циклический сложный эфир, представляющий собой шестичленное кольцо состоящее из четырех атомов углерода и двух атомов кислорода карбоксильные и гидроксильные группы этерифицируются. В результате образуются лактиды кристаллические вещества. [1]

Пищевая молочная кислота представлена в виде водного раствора с массовой долей 40 Так же её получают и в 70% концентрации, для чего проводят вторичное упаривание в вакуум-аппаратах с последующим фильтрованием на фильтр-прессах. Продукт выпускается в жидком виде или в виде пасты, которую получают добавлением к концентрированной кислоте небольшого количества мела. [4]

### 1.1.2 Применение молочной кислоты

Молочная кислота очень важна в жизни человека. Она и её производные активно применяются в пищевой промышленности, используются в медицине и ветеринарии, а также для различных технических целей. [4]

Лактат используется в консервной, мясоперерабатывающей, рыбной, молокоперерабатывающей, масложировой и других отраслях пищевой промышленности. Так же применяется для производства безалкогольных напитков и некоторых сортов пива, кондитерских изделий.

Например, благодаря своим антисептическим свойствам, в пищевой промышленности молочная кислота используется в качестве консерванта и антиоксиданта при изготовлении таких продуктов как детское питание, пиво, молочные продукты, мясо, корма для животных. Лактат предотвращает порчу продукта и влияет на увеличение срока годности. Как консервант его используют и при изготовлении многих фармацевтических, косметических и табачных изделий. [5]

Молочная кислота как правило придает продуктам лучший вкус, а также обладает профилактическими свойствами и с успехом может использоваться вместе с уксусной и лимонной кислотами. В масложировой отрасли промышленности лактат используют при изготовлении майонеза, маргарина и сливочного масла, а также для приправ и соусов. Саму молочную кислоту добавляют в пищу при изготовлении пастообразных продуктов после того, как смешивают жировую и водную фазы до достижения pH 4,4- при этом получают эмульгиованный продукт с 19% жирности и калорийностью меньше 200 калорий на 100г.

Наиболее сильное антибактериальное действие при меньшей кислотности достигается при совместном влиянии молочной и уксусной кислот, а продукт в результате обладает нежным ароматом и более мягким кислым вкусом.

При использовании лактатов в комплексе с молочной кислотой значительно повышается микробиологическая защита образующегося продукта, улучшается не только его качество, но и функционально-технологические характеристики. Значительное положительное влияние на конечный продукт оказывается при использовании лактатов калия, натрия, кальция, магния, аммония и железа в качестве донора катионов при изготовлении маргарина и масляной пасты, с небольшим процентом жирности. [6]

Лактат ограничивает развитие микроорганизмов, вызывающих гнилостные процессы, но не влияет на жизнь микроскопических грибов и дрожжей. Он и его соли при наличии воды становятся сильными пластификаторами почти всех белков. При изготовлении хлеба наличие молочной кислоты увеличивает объем мякиша и улучшает качество корочки.

В процессах пивоварения молочную кислоту добавляют в затор для достижения снижения жесткости воды и установления оптимальной pH для работы ферментов, обладающих амилолитической и протеолитической активностью. Так же молочная кислота используется в процессе производства пекарных дрожжей, применяя её для очистки засевных дрожжей от лишней микрофлоры, например лактобацилл, а также для очистки мелассы, с целью стимулирования размножения дрожжей.

В пищевых продуктах разрешено использование таких лактатов, как лактат натрия (Е325), калия (Е326), кальция (Е327), аммония (Е328) и магния (Е329).Они применяются при изготовлении безалкагольных напитков, карамельных масс, различных кисломолочных продуктов. На повышения объема и стабильность пенной фракции в белково-сбивных массах кондитерских изделий и мороженного влияет лактат натрия. В медицине и ветеринарии, как один из важнейших терапевтических препаратов используют лактат кальция, который восполняет необходимые организму соединения при лечении кальциевой недостаточности (рахита). Также лактат кальция используется в качестве кровеостанавливающего средства при различных легочных, желудочно-кишечных, носовых и других кровотечениях, оказывает влияние на повышение свертываемости крови благодаря чему применяется в хирургической практике и для снятия зуда в случае аллергических реакций.

В сельском хозяйстве лактат используется для приготовления и консервирования кормов. Также в данной отрасли постоянно растет спектр использования молочной кислоты в виде подкисляющего и консервирующего вещества, а также для очистки, дезинфекции и добавки в кормовой рацион. [4]

В низких концентрациях она используется в виде буферной субстанции в процессе изготовления косметических и фармацевтических препаратов для достижения кислотного значения pH. В этих областях использования мировая потребность в получаемом путем ферментативных реакций лактате, оценивается в настоящее время в 250.000 т/год. Довольно широкое использование молочная кислота получила и в ветеринарии. Она давно применяется в виде противобродильного вещества преджелудков жвачных и желудка лошадей, а также способствует расслаблению желудочных и кишечных сфинктеров. Молочная кислота угнетает рост и развитие условно патогенных и гнилостных бактерий, составляющих микрофлору желудочно-кишечного тракт, в связи с чем снижается образование токсичных продуктов образующихся в результате распада органических веществ в организме. Также она улучшает процессы обмена веществ, возбуждает деятельность пищеварительных желез и повышает половую активность. Кроме того, она принадлежит к эффективным средствам использующимся при дезинфекции воздушной среды животноводческих и птицеводческих заведений в виде аэрозолей. В тоже время профилактика заболеваний органов дыхания у телят и респираторных заболеваний у цыплят осуществляет при использовании молочной кислоты в комплексе с йодтриэтиленгликолем. Кроме того, при наружном применении она обладает дезинфицирующим (10-30%-ный раствор), кератолитическим (10%-ный раствор), прижигающим (10-40%-ный раствор) действиями. [7] В производстве косметики: увлажняющие свойства молочная кислота входит в состав комплекса веществ, обеспечивающих влагоудерживающие свойства; отшелушивание. Молочная кислота разрушает белковые связи между старыми клетками ороговевающего слоя. Из за этого клетки легко отслаиваются и смываются. Поверхность кожи становится более ровной и гладкой. Это качество молочной кислоты используется для удаления следов и рубцов после угрей; антираздражающие свойства; улучшает толщину и состояние. Увеличивает эластичность и плотность коллагеновых и эластановых волокон; антимикробное действие молочная кислота входит в состав кислотного слоя кожи. Кислая среда губительна для многих микроорганизмов. Именно поэтому, верхний слой кожи оказывается защищен от развития патогенных микробов. Молочная кислота угнетает рост преимущественно анаэробных бактерий; рН регулятор кожи. При некоторых дерматитах рН кожи растет, уменьшается кислотность. Молочная кислота, входящая в состав косметических средств, стабилизирует рН баланс.[8]

Молочная кислота используется для вымачивания льна и кожи в кожевенной отросли промышленности. Так же она используется для удаления извести при двоении кожи и обработке пушнины, а в текстильной отросли молочная кислота и её сурьмяная соль используются в протравном крашении и отделке тканей. Лактаты применяются в качестве аналогов антикоррозионных агентов в растворах антрифризов. [4]

В промышленности для получения пластификаторов (PLA). Следующей, особенно важной в будущем областью применения молочной кислоты, является производство биологически разлагаемой полимолочной кислоты PLA методом непрерывной полимеризации. Исследования показали, что 22% всех произведенных полимерных материалов применяется для упаковки, в основном для упаковок одноразового пользования. Только в Германии это количество составляет 1,5 млн т/год.

Из полимолочной кислоты возможно производство таких продуктов, как покрывающая пленка для сельского хозяйства, системы укрепления грунта для садоводства и возделывания виноградников, одноразовые изделия медицинского применения для больниц, а также упаковка для продовольственных продуктов и товаров широкого потребления. [9]

Этил- и бутиллактаты используются в виде растворителей эфиров целлюлозы, олиф, растительных масел; бутиллактат используется также как растворитель некоторых синтетических полимеров. Важное значение молочная кислота приобретает и как мономер при получении биоразлагаемых полимеров.[4]

### 1.1.3 Производство молочной кислоты

Молочная кислота является простейшей гидроксикислотой, имеющей асимметричный атом углерода, благодаря которому обеспечивается существование двух оптических изомеров, т. е. D (или R) и L (или S) форм. L-Молочная кислота усваивается организмом, а D-изомер нет.

Молочная кислота в промышленности производится химическим (50%) и ферментативным (50%) синтезами. Химический синтез получения лактата основан на реакции ацетальдегида с цианистым водородом, в результате которой образуется лактонитрил, гидролиз которого дает собственно молочную кислоту. При получении молочной кислоты с помощью молочнокислых бактерий и химическим синтезом образуется оптически недеятельная D,L-молочная кислота. L(+)-Молочную кислоту образуют молочнокислые стрептококки (*Streptococcus termophilus, Streptococcus lactis, Leuconostoccremoris*), а *Lactobacillus lactis и Lactobacillus bukgaricus* продуцируют около 90 D (–)-молочной кислоты. В промышленности при изготовлении молочной кислоты возбудителем молочнокислого брожения является культура *Lactobacillus delbrukii*.

## 1.2 Молочнокислые бактерии

Молочнокислые бактерии принадлежат к таким семействам, как *Lactobacteria и Streptococcaceae*. Это морфологически гетерогенная группа бактерий, так как включает в себя и палочковидные,и сферические организмы. Эти бактерии относятся к грамположительным, не образуют эндоспор (кроме *Sporolactibacillus inulinus*) и практически все неподвижны. Они относятся к факультативным анаэробам, и в качестве энергии используют молочную кислоту. Самостоятельно они не способны синтезировать АТФ и дыхание отсутствует. Так как для молочнокислых бактерий характерен рост в молоке и других средах, богатых питательными и ростовыми веществами, то для них характерна сложная потребность в факторах роста. Для нормального развития им необходимы витамины группы В, аминокислоты, пурины и пиримидины. Как следствие энергетического метаболизма для молочнокислых бактерий характерна повышенная устойчивость к кислоте. Важным селективным значением для бактерий молочной кислоты является способность обрабатывать и переносить высокие концентрации лактата, что дает им возможность конкурировать с большинством других бактерий в богатых питательными веществами средах. Молочнокислые бактерии можно разделить на две подгруппы разделив и по образующимся в результате брожения из глюкозы продуктам:

Гомоферментативные образующие практически только одну молочную кислоту. Сюда относятся бактериивидов *Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillusplantarum, Enterococcus faecalis и* др.

Гетероферментативные образующие смесь молочной кислоты, этанола, углекислого газа, а иногда и уксусной кислоты. Сюда относят бактерий видов *Leuconostoc mesenteroides, Leuconostocdextranicum, Lactobacillusbrevis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus celobiosus* и др.

В естественных условиях они встречаются: в молоке и молочных продуктах, а также в местах переработки молока (*Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus lactis и другие лактобациллы; Streptococcus lactis*); на поверхности растений, в качестве эпифитной микрофлоры и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Leиconostoc mesenteroides*); в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных как представители нормальной микрофлоры (*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus faecalis, Streptococcus bovis* и др.).

Молочнокислые бактерии представляют собой важную группу имеющую большое экономическое значение, ведь они не только служат возбудителями болезней человека и животных, но еще и используются для приготовления пищевых продуктов.undefined

### 1.2.1 Использование молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии используются для приготовления:

1) силоса; 2) квашеной капусты, огурцов и др. (*Leuconostos mesenteroides и Lactobacillus plantarum*);

3) молочнокислых продуктов. Они сбраживают стерилизованное и пастеризованное молоко и сливки. Их прибавляют в качестве закваски для чистых культур молочнокислых бактерий. Также для изготовления различных молочнокислых продуктов берутся соответствующие им микробные закваски. Например, для изготовления йогурта применяют пастеризованное молоко, сквашенное с помощью бактерий *Streptococcus thermophilus и Lactobacillus bulgaricus*. Для кефира -*Lactococcuslactis, Lactobacillus kefir, Lactobacillus kefiranofaciens*; сметаны *Lactococcus cremoris, Lactococcus lactis, Leuconostoc lactisи Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* (но сквашиваются пастеризованные сливки);

4) сырокопченых колбас. Образующаяся при брожении молочная кислота дает определенный вкус, а также снижает рН, что предохраняет от порчи те виды колбас, которые не подвергаются варке;

5) кислого теста в хлебопечении. Образующаяся молочная кислота используется для подъема теста, а также придает хлебу специфический кислый вкус;

6) получения чистой молочной кислоты, которая применяется в кожевенной, текстильной, фармацевтической, пищевой промышленности и для получения биодеградируемых полилактидов, используемых для упаковки пищевых продуктов. [10]

### 1.2.2Свойства молочнокислых бактерий.

*Lactobacillus delbrüeckii* (*Lactobacillus bulgaricus*) термофильная бактерия. Эти бактерии прекрасно сбраживают такие сахара как, глюкозу, мальтозу, фруктозу, галактозу и сахарозу.

Молочнокислые бактерии относятся к грамположительным, неподвижным, факультативным анаэробам. По форме они напоминают крупные палочки длинной 7-8 мкм, а толщиной 0.5-0.8 мкм, образуя, как правило, короткие цепочки из 2-4 клеток.

Для нормального функционирования молочнокислым бактериям необходимы следующие аминокислоты: аргинин, цистеин, глутаминовая кислота, лейцин, фенилаланин, триптофан, тирозин, лизин и некоторые другие. Из витаминов продуценту необходимы рибофлавин, никотиновая и фолиевая кислоты. Тиамин же напротив ингибирует образование молочной кислоты.

В качестве продуктом минерального питания молочнокислым бактериям требуются такие металлы и не металлы, как Na (натрий), K (калий), P (фосфор), Cu (медь), Fe (железо), S (сера), Mg (магний) и в большем количестве Mn (марганец). Поэтому к сахаросодержащим средам необходимо добавлять сухие ростки ячменного, ржаного или пшеничного солода, солодовый экстракт, осадочные винные или спиртовые дрожжи, дрожжевой автолизат, пшеничные зародыши.

Температурный оптимум развития для большинства продуцентов молочной кислоты составляется 48-50 °С; брожение осуществляется в слабокислой среде (рН»5,5), но при рН 3,0 развитие бактерий прекращается. Если рН питательной среды выше 7 она легко инфицируется.

Вследствие чувствительности к кислотности среды образующуюся молочную кислоту нейтрализуют мелом, поддерживая кислотность на уровне 0,3–0,4 2С3Н6О3 СаСО3 Са(С3Н5О3)2 СО2 Н2О Растворимость лактата кальция при 50 °С составляет 15–16%.

#### 1.2.2.1 Сырье для производства молочной кислоты.

Касательно сырья для получения молочной кислоты, в книге: «Новый справочник химика и технолога» приводится следующая информация:

«В отечественном производстве молочной кислоты сырьем служит смесь тростникового сахара-сырца, рафинадной патоки и свекловичной мелассы. Источником необходимых органических и минеральных веществ как правило служат солодовые ростки.

Применение мелассы позволяет ускорить процесс брожения из-за наличия в ней необходимых для молочнокислого брожения веществ. Однако из-за интенсивной окраски мелассы применение большого ее количества приводит к затруднениям при очистке молочной кислоты.

Рафинадная патока представляет собой вязкую коричневую жидкость, с массовой долей сухого вещества не менее 72 %, в том числе 49 % сахарозы, величина рН не ниже 5,5.

По сравнению с мелассой она имеет большую доброкачественность, примерно вдвое меньшую цветность, содержит меньше коллоидов (1,3-3,0 %), золы (3-5 %) и азота (0,25 %), больше инвертного сахара (10-20 %), но в ней отсутствуют витамины.

Солодовые ростки содержат до 30 % азотистых веществ, около половины которых растворяются в воде. В ростках заключена основная масса витаминов и биостимуляторов проросшего зерна: рибофлавин, пиридоксин, цианокобаламин, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, токоферол, инозит, биотин. Ростки должны быть желтого или коричневого цвета; допускается присутствие 5-6 % зерновой примеси; минеральных веществ — не более 0,5 %.

Для получения молочной кислоты можно использовать ультрафильтраты молока и сыворотки, отходы производства фруктового сока.

Однако лучшим субстратом является D-глюкоза (выход молочной кислоты 86%) которую можно заменить, например, гидролизатами древесины, осуществляя конверсию с помощью иммобилизованных в альгинате кальция клеток *Lactobacillus plantarum* ETH B-4258». [4]

### 1.2.3 Технология производства молочной кислоты

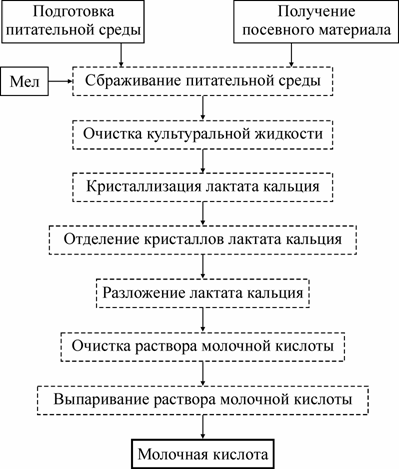


Рисунок 1.2 – Технологическая схема производства молочной кислоты

Промышленное производство молочной кислоты подробно приводится в книге «Новый справочник химика и технолога»:

«Процесс получения посевного материала осуществляется в несколько стадий. На первом этапе чистая культура высевается в три пробирки со свежеприготовленной питательной средой. Две пробирки выполняют функции «музейной» и «запасной», культуру же из третьей пробирки высевают в колбу объёмом 500 мл, затем – в 10 л среды (в бутыль), и, наконец, в реакционный объём культиватора. Объем засеваемой культуры должен составлять до 30% объема всего бродильного аппарата.

Культивирование в ходе первых двух стадий осуществляется на питательной среде из солодового сусла. Во время третьей фазы питательная среда состоит из сусла и производственной среды в соотношении 1:1, а на последнем этапе используется 100% производственная среда. Длительность каждой из стадий составляет порядка 20–24 ч (с температурным режимом +48–50 °С).

Оценка зрелости и метаболической активности культуры осуществляется на основе измерения плотности популяции бактерий, которая должна составлять порядка 700-800\*108 клеток/мл. Через 10-15 ч культивирования активная культура способна накопить до 0,5% молочной кислоты.

Процедура подготовки инокулята заключается в повторяющемся несколько раз пассировании бактерий в среде с небольшим количеством мела при 45-55 °С на протяжении 16-18 часов.

При загрузке бродильного аппарата питательную среду готовят непосредственно внутри него. Для этого аппарат наполняют водой на 2/3 вместимости и нагревают до +70 С, после чего подают внутрь мелассу, рафинадную патоку и раствор сахара сырца, солод или кукурузный экстракт; массовая доля сахара в растворе должна составлять 3-4%. Также в раствор добавляют соли (NH4)2SO4 и NH4HPO4. Смесь стерилизуется пастеризацией при +70 С в течение 1 ч. После охлаждения до температуры 48-50 °С в раствор добавляют 15 % от массы сахара солодовых ростков.

Молочнокислое брожение – образование молочной кислоты – может быть описано уравнением:

                                       С6Н12О6 → 2С3Н6О3

Как можно видеть, в идеальных условиях из 100 г глюкозы получается 100 г молочной кислоты; практический выход обычно составляет 90-91% от массы сахара. Поскольку при температуре ниже 45 °С возникает риск прорастания в реакционном объёме посторонних микроорганизмов, брожение проводят при рабочей температуре 48-50 °С. Температура выше 55 °С снижает активность молочнокислых бактерий. Реакционный объём бродильного аппарата составляет 25-45 м3.

Культуральную жидкость с молочнокислыми бактериями вносится в бродильный аппарат с готовой средой (20 об.от его вместимости). Перемешивание смеси барботированием воздуха начинается через 6 ч. По достижении массовой доли молочной кислоты 0,5-0,6 масс. (примерно через сутки после засева) в питательную среду начинают вводить меловое молоко, поддерживая массовую долю кислоты в растворе на уровне 0,3-0,4 масс.

Для нейтрализации 1 кг молочной кислоты требуется 0,55 кг карбоната кальция. В результате нейтрализации образуется 120% лактата кальция от массы сброженной гексозы или 125% от массы дисахарида.

За сутки осуществляется сбраживание сбраживается до 2 сахара, убыль которого компенсируют внесением 50% раствора сахара-сырца с добавлением рафинадной патоки, поддерживая массовую долю сахара в среде на уровне 3-4 Брожение осуществляют до тех пор, пока концентрация лактата кальция не достигнет примерно 15% (6-8 суток).

Для очистки культуральную жидкости от твёрдых примесей, таких, как мел, солодовые ростки, а также коллоидные частицы, её обрабатывают водным раствором гидроксида кальция температурой 70-80°С, в процессе чего осаждаются ионы железа, коагулируют белки и разрушается несброженный сахар. Культуральная жидкость отстаивается при температуре выше 48°С в течение 6-12 ч, после чего фильтруется. Фильтрат с первой порцией промывной воды направляется на кристаллизацию лактата.

В процессе кристаллизации лактата кальция около 2/3 соли остается в маточном растворе, поэтому, наряду с очисткой молочной кислоты кристаллизацией лактата, используется очистка и ионообменными смолами.

При кристаллизации лактата кальция начальная концентрация его в растворе составляет 14,5-15,5 при большей концентрации затрудняется отделение кристаллов из-за их малых размеров. Оптимальная начальная температура раствора составляет 30 °С. После заполнения кристаллизатора, вносят затравку (6-7% от массы лактата) в виде сырых кристаллов от предыдущей кристаллизации. Конечная температура раствора не должна превышать 10 °С; общая продолжительность кристаллизации 10-12 ч.

В процессе кристаллизации температуру снижают за первый час с 30 до 23°С, за последующие 1,5 ч с 23 до 16 °С (начинается массовая кристаллизация). Далее температуру снижают со скоростью 2 град./ч, и затем смесь выдерживают 3 ч при 10 °С. После отделения кристаллов фильтрованием или центрифугированием и их промывки выход лактата составляет 80%. от массы кристаллов, содержащихся в утфеле, при доброкачественности 96%

Из маточного раствора после разложения лактата, отделения гипса и осветления раствора активным углем получают молочную кислоту второго сорта.

http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/images/15_7(5).files/image015.gifЗная содержание лактата в начальном (Сн) и конечном (См) растворах (масс. %), можно вычислить его выход в процентах к массе раствора (*K*, безводное вещество) или в процентах к содержанию лактата в начальном растворе (*А*):

Очищенный раствор лакатата кальция разлагается серной кислотой:

                     Ca(C3H5O3)2 + H2SO4 = 2C3H6O3 + CaSO4

Сульфат кальция выделяется из раствора в виде осадка (гипса). Для получения крупнокристаллического осадка гипса необходимы следующие условия: коэффициент пересыщения 1,3-1,4; массовая доля лактата кальция не выше 18 масс. %; температура 80 °С; избыток серной кислоты 0,5 %; продолжительность созревания кристаллов гипса 1 ч.

Полноту разложения лактата кальция контролируют с помощью цветной реакции с 0,1% раствором метилового фиолетового, который должен иметь васильковый цвет, при избытке серной кислоты – зеленый, лактата кальция – фиолетовый.

Соединения железа осаждают желтой или красной кровяной солью, причем применение последней предпочтительней, поскольку образующийся лактат кальция разлагается далее с образованием нерастворимого сульфата кальция:

4Fe(C3H5O3)3 + 3Ca[Fe(CN)6] = Fe4[Fe(CN)6]3 + 6Ca(C3H5O3)2

Соединения тяжелых металлов и мышьяка осаждают сульфидом бария. Для осветления раствора его обрабатывают активным углем, осадок отделяют фильтрованием.

Осветление и выпаривание раствора молочной кислоты проводят с помощью активного угля или до отделения гипса, или после отделения шлама. Осветленный раствор подвергают концентрированию до массовой доли молочной кислоты 40% на выпарных вакуумных аппаратах (80 кПа). После выпаривания раствор снова обрабатывают активным углем (исправление) и после фильтрования разливают в тару». [4]

## 1.3 Технологии улучшения инкубации продуцентов молочной кислоты

Для увеличения продуктивности процесса производства молочной кислоты существует ряд подходов, направленных на изменения условий инкубации молочнокислых бактерий: изменение состава питательной среды; изменения уровня оптимальной температуры и рН.

Широко известен тот факт, что среди большинства группы кокков присутствуют культуры, биосинтезирующие молочную кислоту и причисляемые к молочнокислым бактериям. Так же важно не забывать тот факт, что среди молочнокислых бактерий, относящихся к кокковым формам, существуют как термофильные, так и термотолерантные культуры.

При использовании кокковых форм оптимальная температура для культивирования составляет 45-50º C . Поддержанием оптимального pH 6.6-7 осуществляли путем добавления Ca-содержащих соединений. Проводили контроль потребления глюкозы. При снижении концентрации сахара вносили глюкозу и солодовые ростки.

Таким образом, по сравнению с известными традиционными способами получения молочной кислоты, предложенный способ предусматривает использование в качестве продуцента кокковых форм молочнокислых бактерий, способных к росту при повышенной температуре, преимущественно термотолерантных молочнокислых бактерий. [11]

Также, немаловажным фактором в процессе получения молочной кислоты является состав субстрата, на котором будет развиваться продуцент.

Например, при использовании в качестве продуцентов обычные микроорганизмы, умеренно термофильных кисломолочных бактерий, *Rhizopus* и *Aspergillus* (Предпочтительными являются умеренно термофильные бактерии такие как *Bacillus coagulans, Bacillus thermoamylovorans, Geobacillus stearothermophylus и Bacillus smithii*, потому что эти типы микроорганизмов может бродить при относительно высокой температуре), в качестве субстрата используется концентрированный сырой свекольный сок. Так что стоит отметить, что такой субстрат (свекольный сок) имеющий концентрацию не меньше 60 Брикс (т.е. количество сахара в массе на 100 г жидкости) стабилен при хранении, не чувствителен к инфекции и может быть использован в качестве субстрата для ферментации в производстве молочной кислоты в промышленных масштабах с тем же выходом химической и оптической чистоты, прозрачностью и вкусом как у молочной кислоты, полученной от брожения белого сахара. [12]

Весьма интересным подходом выбора продуцентов для получения молочной кислоты является выбор смешанной бактериальной культуры. В такую культуру обязательно должны входить по меньшей мере один представитель гомоферментативных молочнокислых бактерий (*Lactobacillus rhamnosiis, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus casei, Lactobacillus acideophilus, Lactobacillus bulgaricus* или их комбинации) и гетероферментативных молочнокислых бактерий (*Lactobacillus Pentosus Lactobacillus brevis, Lactobacillus lactis* или их комбинации). Такой способ позволит данной культуре расщеплять не только гексозы, но и пентозы. [14]

Для того, чтобы сделать процесс получения молочной кислоты менее затратным и легким, существуют разработки по замене сахара. Одним из таких способ является осахаривание крахмала ферментированной и сжиженной смесью глюкоамилазы и альфа-амилазы. Как результат – образуется значительно меньше остаточных сахаров, и не требуется экстракция остаточных сахаров. Для данного способа используют консорциум молочнокислых бактерий родов *Bacillus coagulans (Lactobacillus Sporogenes), Bacillus, Bacillus thermoamylovorans smithii, Geobacillus stearothermophilus*. Температурный оптимум 30-65º, при pH 3-8.5, но наиболее предпочтительным будет pH 5.5-5.6. Одновременно процесс осахаривания и ферментации может быть осуществлен на крахмальной суспензии или в любой другой крахмалсодержащей смеси. Крахмал может быть сжиженный или нет. Осахаривание и ферментации так же могут быть объединены с сжижением, также в ферментационной среде могут присутствовать альфа-амилазы. Польза данного процесса в том, что в его результате получается значительно меньше остаточных сахаров по сравнению с обычным процессом ферментации, что делает возможным прямое выделение молочной кислоты. Таким образом, настоящее изобретение делает процедуры обработки легкой и недорогой, не требуя сложной стадии экстракции для отделения молочной кислоты от остаточных сахаров. Дополнительным преимуществом данного способа является возможность использования сырого крахмала, так как низкие остаточные количества сахара, требуют использования небольшого количества очищенного крахмала в качестве исходного продукта. [13]

Как пример изменения условий инкубации молочнокислых бактерий – это изменение pH до 4 или даже меньше, при температуре от 30 до 50°С в питательной среде содержащей кукурузную воду. Кукурузная вода используется в качестве питательной среды, включает в себя глюкозу, фруктозу или их смесь, дрожжевой экстракт, неионогенные поверхностно-активные вещества, фосфат калия, сульфат магния, сульфат марганца, цитрат амония, карбонат кальция и др. Все компоненты, за исключением неионогенного поверхностно-активного вещества и карбоната кальция, как правило растворены в пропорциональном количестве воды и стерилизованы в автоклаве. Неионогенные поверхностно-активные вещества, как правило, добавляют к среде в автоклаве, при температуре, близкой к 100 ° С. Полученный раствор затем, как правило, охлаждают до около 60 ° С или меньше и добавляют карбонат кальция. Данный способ получения молочной кислоты включает в себя инкубирование гомоферментативных молочнокислых бактерий в питательной среде с получением ферментативного бульона с высоким уровнем свободной молочной кислоты. [15]

## 1.4 Основные подходы получения продуцентов молочной кислоты

Практически все методы получения продуцентов молочной кислоты относятся к биотехнологическим.

Основной целью совершенствования подходов получения продуцентов молочной кислоты является повышение удельного выхода качественной молочной кислоты на стадии биосинтеза и дополнительное снижение энергозатрат на осуществление этого процесса.

Кроме способов направленных на усовершенствование субстрата, для лучшей продуктивности молочнокислых бактерий, существуют и методы, направленные на выведение новых штаммов. Например, штамм *Lactobacillus delbrueckii* B-8744 был получен в результате отбора спонтанных мутаций штамма бактерий *Lactobacillus delbrueckii* Л-3. Выбор молочнокислых бактерий осуществляли по качеству колоний и количеству образующейся в процессе биосинтеза молочной кислоты в культуральной жидкости. Генетическая устойчивость отбираемых штаммов достигалась путем их неоднократных пересевов на плотные питательные среды. Выросшие на данных средах колонии затем пересевали в жидкую питательную среду. В результате был получен новый генетически устойчивый штамм молочнокислых бактерий, в результате использования которого повышается выход целевого продукта (молочной кислоты). [16]

Новый генетически устойчивый штамм *Еenterococcus faecium* В-2240 D был выделен из монокультуры бактерий *Enterococcus faecium* из молочной сыворотки и селекционирован путем длительных пересевов отдельных колоний на среде. Для приготовления питательной среды использовались отходы и вторичные ресурсы перерабатывающих отраслей промышленности. Отбор штамма так же осуществлялся по качеству колоний и количеству образующейся в процессе биосинтеза молочной кислоты в культуральной жидкости. Генетической устойчивости отбираемых штаммов достигали путем их неоднократных пересевов на плотные питательные среды. Выросшие на них колонии затем пересевали в жидкую питательную среду для лактобацилл. В результате получен новый генетически устойчивый штамм энтерококков, имеющий такие особенности, как высокая скорость роста бактериальных клеток, что обеспечивает сокращение производственного цикла и увеличение удельного выхода целевых продуктов, высокая продуктивность штамма и синтез молочной кислоты исключительно в L(+)-форме. [17]

Рекомбинантный штамм дрожжей *Shizosaccharomyces pomde* Y-4042, являющийся продуцентом молочной кислоты был получен путем трансформации штамма-реципиента *Shizosaccharomyces pomde* Y-3106интегративной плазмидой ДНК pcDNA-Km-leu1-pla, сконструированной на основе вектора pUC19 и содержащей ген лактатдегидрогеназы Idh 1 молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*. Данная культура способна сбраживать глюкозу, сахарозу, мальтозу и раффинозу. Не способна к брожению галактозы, лактозы и мелибиозы. Ассимилирует в качестве единственного источника углерода сахарозу, мальтозу, раффинозу. Не ассимилирует галактозу, целлобиозу, трегалозу, лактозу, ксилозу, арабинозу, рибозу, рамнозу, эритрит, рибитол, маннит, крахмал, янтарную, лимонную кислоты, инозит культура не ассимилирует нитраты, не способна расти на среде без витаминов. Оптимальные условия для размножения штамма – температура 30°C, pH 6, полная дрожжевая среда. Полученный штамм *Schizosaccharomyces pombe* Y-4041сохраняет способность к образованию молочной кислоты после 18 последовательных пересевов на полноценной среде. При культивировании на среде YPD способен продуцировать молочную кислоту в количестве 50 г/л культуральной жидкости. [18]

Штамм *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 был выделен из перегретого зерна(пшеницы) с характеристиками микробной деградации. Пшеницу перемалывали, и крахмал разжижали. Полученный гидролизат с содержанием сахара 18-20% использовали при 60°С в качестве обогащенной культуры. Последующая селекция штамма микроба была достигнута с применением стандартных микробиологических способов. Штамм микроорганизма растет на моносахаридах глюкозе, маннозе, галактозе, фруктозе и на дисахаридах сахарозе, мальтозе, целлобиозе. Из полисахаридов он растет на крахмале. Лактоза не сбраживается. Он не способен разрушать казеин и желатин. Данный штамм используют в способе получения L(+)-лактата путем культивирования при температуре между 53-65°С на среде, содержащей частично сбраживаемые сахара. Изобретение позволяет получать L(+)-лактат при более высоких температурах, причем выход составляет более 95%. [19]

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1 Объект исследования

Таблица 2.1 - Характеристика бактерий и плазмид использованных в работе

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Название штамма** | **Характеристика** | **Источник** |
| E. coli DH5α | fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 | [31] |
| E. coli XL1-Blue | F'::Tn10(TcR) proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1, gуrA96(NalR) thi hsdR17 (rk-mk+) glnV44 relA1 lac | [32] |
| **Название плазмиды** | **Характеристика** | **Источник** |
| pMTL21C | AmpR, CmR. ColE-репликон, tac-промотор, полилинкер (3,543kb). | [33] |

## 2.2 Среды и растворы

В работе использовались:

1.Питательный бульон:

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов (на основе рыбного гидролизата) 20 г

Дистиллированная вода 1 л

С помощью NaOH pH доводили до 7

Стерилизовали путем автоклавирования при 0,5 атм. 30 минут .

2. Отмывающий раствор

Tris 25 мМ рН 8.0 на 500мл: Tris 1М рН 8.0 12,5мл

EDTA 10 мМ рН 8.0 EDTA 0,5 М рН 8.0 10,0мл

NaCl 150 мМ NaCl 5 М 15,0мл

Дистиллированная вода до 500мл

3. Физиологический раствор 0,9 %

NaCl 0.9г

Дистиллированная вода 1 л

Стерилизовали путем автоклавирования при 0,5 атм. 30 минут.

4. Раствор I

глюкоза 50мМ на 250мл: глюкоза 2,475г

EDTA 10мМ рН 8.0 EDTA 0,5М 5мл

Tris 25мМ рН 8.0 Tris 1,0М рН 8 6,25мл

Дистиллированная вода до 250мл

5. Раствор II

SDS 1% на 20мл: SDS 10% 2мл

NaOH 0,2н 2н NaOH 2мл

Дистиллированная вода 16мл

6. Раствор III

ацетат К 3(5)М рН4,8 на 500мл: 5М ацетат К 147,21г

титровать уксусной кислотой

Дистиллированная вода до 500 мл

7. ТЕ-буфер

10мМ Tris-HCl, рН=7,2 на 50 мл: Tris 1М рН 8.0 0,5мл

1мМ EDTA , рН=8 EDTA 0,5 М рН 8.0 0,2мл

Дистиллированная вода до 50мл

8. Агарозный гель для электрофореза:

Агароза 1 г

ТАЕ-буфер (1Х) до 100 мл

9.ТАЕ-буфер(1Х)

ТАЕ(50Х) 20 мл

Этидиум бромид 30мкл

Дистиллированная вода До 1 л

10.Агаризованная полноценная среда(на основе рыбного гидролизата):

|  |  |
| --- | --- |
| Агар-агар бактериологический (порошок) | 4.5 г |
| Питательный бульон для культивирования микроорганизмов | 300 мл |
| Доводили pH до 7,0-7,1.  Стерилизовали путем автоклавирования при 0,5 атм 45 минут. | |

## 2.3 Методы исследования

### 2.3.1 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Для выделения плазмидной ДНК подготавливаем ночную культуру.

Плазмидную ДНК из Escherichia coli GM2163 выделяли методом щелочного лизиса с модификациями по ниже изложенной методике:

Выделение из 2мл (V) культуры.

1. 1,5 – 2,0 мл ночной культуры, выращенной с селективным агентом, перенести в эппендорф, осадить ценрифугированием 8.000х5-7 мин, супернатант слить.
2. К осадку добавить 1.0 мл отмывающего раствора, ресуспендировать пипетманом или на блендоре (вортекс 10 –15 сек).
3. Биомассу осадить ценрифугированием 8.000х5-7 мин, супернатант слить.
4. К осадку добавить 200мкл (1/10 V) р-ра I, ресуспендировать пипетманом или на блендоре (вортекс 10 –15 сек). Инкубировать при 37˚С 15-30 мин.
5. Добавить 400мкл (2/10 V) р-ра II, перемешать, но не интенсивно (достаточно медленно перевернуть эппендорф 3-4 раза). Наблюдается полное просветление жидкости. Больше 10 мин не держать во втором растворе.
6. Добавить 300мкл (1,5/10 V) р-ра III. Выпадают белые хлопья. После можно и желательно перемешать, но не интенсивно (достаточно медленно перевернуть эппендорф 3-4 раза). Инкубировать 15-30 мин на льду (я всегда ставлю в морозилку на -20˚С).
7. Центрифугировать 18-20.000g 30 мин при 0… + 4˚С.
8. Отобрать супернатант, к нему добавить 600мкл (3/10 V или 0,6 от конечного объема) изопропанола, перемешать - перевернуть эппендорф 3-4 раза.
9. Центрифугировать от 8.000 до 13.000 об/мин 10-15 мин при 0… + 4˚С. Супернатант слить.
10. К осадку добавить 200мкл ТЕ-буфера, ресуспендировать: ДНК до 7-8 kb - пипетманом или вортекс 10 –15 сек, 7 – 15 kb аккуратно пипетманом, более 15 kb вращать эппендорф.
11. Добавить 200мкл (равный объем) 10-12М LiCl или 8М ацетата аммония, и инкубировать при -20˚С 3,5 и 0,5 часа соответственно.
12. Осадить белок центрифугированием 18-20.000g 15 мин при 0… + 4˚С. (режим как и в п.7.).
13. Отобрать супернатант, к нему добавить 250мкл (0,6 от конечного объема) изопропанола или 900мкл 96% этанола, перемешать - перевернуть эппендорф 3-4 раза и на 30 мин в морозильник на -20˚С.
14. Центрифугировать от 8.000 до 13.000 об/мин 10-15 мин при 0… + 4˚С. Супернатант слить.
15. К осадку добавить 100-200мкл 70% этанола, перевернуть эппендорф 1-3 раза, центрифугировать от 8.000 до 13.000 об/мин 10-15 мин при 0… + 4˚С.
16. Супернатант слить, можно отобрать пипетманом, эппендорф сушить на фильтровальной бумаге 0,5 – 2,0 часа (до полного исчезновения явных признаков жидкости).
17. Осадок растворить в 20 мкл (1/100 V исходный) TE-буфера или деионизированной воды. Хранить при -20˚С.

### 2.3.2 Выделение плазмидной ДНК методом kit

Выделение плазмиды с помощью набора для выделения ДНК Thermo Scientific GeneJet Plasmid Miniprep Kit( #K0502, #K0503). Все стадии проводить при комнатной температуре.

Центрифугирование 13000-14000 об/мин

1.Осадить клетки центрифугированием 2 мин. Супернатант слить, осадок ресуспензировать в 250 мкл Resuspension Solution.Затем центрифугировать 1-2 минуты и перемешать на вортексе.

2.Добавить 250 мкл лизирующего раствора, тщательно перемешать, аккуратно переворачивая эппендорф 4-6 раз, пока раствор не станет вязким и более прозрачным.

Примечание. Не использовать вортекс, чтобы не нарушить хромосомную ДНК и не инкубировать более 5 минут, чтобы избежать денатурации суперспиральной плазмидной ДНК.

3.Добавить 350 мкл Нейтрализирующего раствора. Перемешать быстро и тщательно, но не резко, переворачивая эппендорфы 4-6 раз. Примечание. Важно хорошо перемешать смесь после добавления Нейтрализирующего буфера во избежание осаждения бактериального клеточного мусора. Наблюдается помутнение раствора.

4.Центрифугирование 5 минут для осаждения клеточного мусора и хромосомной ДНК.

5.Супернатант перенести в GeneJET колонки. Избегать попадания белого осадка. Примечание. Плотно закрывать крышку колонки GeneJET после каждого использования!

6.Центрифугировать в течении 1 минуты. Вылить супернатант, колонку вернуть обратно в ту же пробирку.

7.К осадку добавить 500 мкл Промывочного раствора(предварительно добавить этанол),затем центрифугировать 1 мин, слить супернатант, колонку вернуть обратно в ту же пробирку

8.Повторяем пункт 7(2 или более раза)

9.Вылить супернатант, центрифугировать 1 мин. Происходит удаление остатков промывочного раствора.

10. Перенести колонки GeneJET в новые 1,5 мл эппендорфы.

Добавить 50 мкл Элюирующего буфера в центр мембраны GeneJET колонки для элюирования плазмидной ДНК. Не прикасаться наконечником к мембране.Инкубировать в течение 2 мин при комнатной температуре, затем центрифугировать в течение 2 мин.

10.Убрать колонку, эппендорф закрыть и хранить плазмидную ДНК при -20 ° С.

### 2.3.3 Протокол рестрикции

Таблица 2.2 Протокол рестрикции

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Наименование реагента* | *Исходная концентрация* | *Концентрация в конечном растворе* | *Объем реактива* |
| ДНК | 120 нг/мкг | 240 нг/мкг | 2мкг |
| Буфер Blue | 10 X | 1X | 2,0 мкг |
| Рестриктаза SmaI | 10 ед./мкг | 1ед.(1X), | 0,2 мкг |
| H2O |  | до 20 мкг | 15,8мкг |

### 2.3.4 Проверка эффективности применения методов на плазмидной ДНК в агарозном геме с помощью электрофореза

Электрофорез в агарозном геле проводили согласно руководству Маниатис [20]

0,7% агароза: 700 мг агарозы + 100 мл буфера

буфер: 100 мл ТАЕ буфера + 2,5 мкл EtBr (10 мкг/мл) м

### 2.3.5 Протокол подготовки вектора и вставки к лигированию.

Таблица 2.3 Протокол лигирования

|  |  |
| --- | --- |
| *Реагенты* | *Количество* |
| 5х буфер для Т4 ДНК полимеразы | 4 мкг |
| ДНК (линейная или ПЦР продукт) | До 1µg |
| dNTP, 2mM каждого | 2 мкг |
| Т4 ДНК полимеразав | 0,2 мкг(1ед.) |
| Вода | До 20 мкг |

Реакция проводится при 11°С 20 минут или 5 минут при комнатной температуре. Инактивация фермента осуществляется при 75-80 °С 10 минут.

### 2.3.6 ПЦР.

Таблица 2.4.программа ПЦР - реакции.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Номер стадии | Температура | Время | Кол-во циклов |
| I стадия  общая денатурация | 94 ˚С | 5 мин | 1 цикл |
| II стадия  1.денатурация 2.посадка праймеров 3.полимеризация | 94˚С 58-60˚С 68 ˚С | 30 сек 20 сек 1 мин 20 сек | 15циклов |
| III стадия  1.денатурация 2.посадка праймеров 3.полимеризация | 94 ˚С 60˚С 68 ˚С | 30 сек 20 сек 1 мин 20 сек | 20циклов |
| I стадия  Досинтез | 72 ˚С | 5 мин | 1 цикл |
| Хранение | 4 ˚С | | До 2 недель |

Таблица 2.5 Праймеры для ПЦР гена LDG 1

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название | Последовательность 5’ – 3’ | Длина, н | Координаты (область гомологии) | Температура плавления (Tm), °С | Содержание GC, % |
| EF-L1-F | aaggaggaagcaggt ATG ACT GCA GCC GCA GGG AAT AAA | 24 | 1-24 | 57/65/60 | 50 |
| EF-L1-R | gacacgcacgaggt TTA TTT TGC TTC TTC TGC TTC AAA TTT AGC | 30 | 984-955 | 55/64/58 | 30 |

Таблица 2.6. Праймеры для ПЦР гена LDG 2.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название | Последовательность 5’ – 3’ | Длина | Координа-ты | Температу-ра плавления (Tm), °С | Содержа-ние  GC, % |
| EF-L2-F | aaggaggaagcaggt ATG AAA GTA TTT AAC AAA AAA GTC GC | 15+26 | 1-26 | 50/58/52 | 27 |
| EF-L2-R | gacacgcacgaggt CTA AGC GTT CGG TTG TAA CGA | 14+21 | 954-934 | 52/60/54 | 48 |

### 2.3.7 Трансформация клеток E.coli.

Поставить ночную культуру: в 5 мл ПБ засеять бактериальную колонию.

1. Ночную культуру развели в 10 раз питательным бульоном.
2. Доращивали до log-фазы на качалке 200-250 оборотов 37°C, 1.5 до2.0 часа .
3. Бактериальную культуру перенесли в стерильные эппендорфы по 1,5 мл.
4. Центрифугировали 5000 об/мин 5мин 4°С.
5. Супернатант удалили, осадок мягко ресуспендировали в 100мкл 0,1М ледяного CaCl2. Эппендорфы оставили на ледяной бане, на 1час для достижения компетентности.(до 18 часов)
6. К компетентным клеткам добавил ДНК 1мкл (до 1 мкг)и оставили в тех же условиях на 30-45 мин.
7. Осуществили температурный шок: 40°С – 40 секунд; 2 мин на ледяной бане.
8. В эппендорфы добавили 1 мл бульона, поместили на качалку на 10-60мин, 200-250 оборотов 37°C (экспрессия).
9. Произвели высев 100 мкл культуры на чашки с селективной средой.

# ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 3.1 Получение промежуточной конструкции пригодной для изучения функциональной активности лактатдегидрогиназ в гомо- и гетерологичном окружении.

Для оптимизации условий амплификации *E.faecalis* БИМ-В1012 с помощью программы Clustal Omega были проанализированы геномы *Enterococcus faecalis* str. Symbioflor , *Enterococcus faecalis* 62, *Enterococcus faecalis* OG1RF, *Enterococcus faecalis* DENG1, *Enterococcus faecalis* V583, *Enterococcus faecalis* D32, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – используемые при анализе L-lactate dehydrogenase 1:

Start-codon

gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor ATGACTGCAGCC …

gb|CP003726.1| Enterococcus faecalis 62 ATGACTGCAGCC …

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis OG1RF ATGACTGCAGCC …

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis DENG1 ATGACTGCAGCC …

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis V583 ATGACTGCAGCC …

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 ATGACTGCAGCC …

gi|295112306| Enterococcus faecalis ATCC 29212 ATGACTGCAGCC…

\* \* \* \* \*\*\* \* \* \* \* \*

Stop-codon

gb|CP008816.1|Enterococcus faecalis ATCC 29212 …GAAGCAAAATAA

gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor …GAAGCAAAATAA

gb|CP003726.1| Enterococcus faecalis 62 …GAAGCAAAATAA

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis OG1RF …GAAGCAAAATAA

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis DENG1 …GAAGCAAAATAA

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis V583 …GAAGCAAAATAA

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 …GAAGCAAAATAA

gi|295112306| Enterococcus faecalis ATCC 29212 …GAAGCAAAATAA

…\* \* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \*

Для LDG2 были проанализированы геномы таких штаммов как: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* DENG1, *Enterococcus faecalis* D32, *Enterococcus faecalis* 62, *Enterococcus faecalis* V583, *Enterococcus faecalis* OG1RF, *Enterococcus faecalis* str. Symbioflor 1

Start-codon

gb|CP008816.1| Enterococcus faecalis ATCC 29212 ATGAAAGTATTTAAC…

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis DENG1 ATGAAAGTATTTAAC …

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 ATGAAAGTATTTAAC …

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis 62 ATGAAAGTATTTAAC …

gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis V583 ATGAAAGTATTTAAC…

gb|CP003726.1 Enterococcus faecalis OG1RF ATGAAAGTATTTAAC …

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor 1 ATGAAAGTATTTAAC …

\* \* \* \* \* \* \*\* \* \*\*\* \* \* \*…

Stop-codon

gb|CP008816.1| Enterococcus faecalis ATCC 29212 …CCGAACGCTTAG

gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis DENG1 …CCGAACGCTTAG

gi|427183854| Enterococcus faecalis D32 …CCGAACGCTTAG

gb|CP002621.1| Enterococcus faecalis 62 …CCGAACGCTTAG

gb|AE016830.1| Enterococcus faecalis V583 …CCGAACGCTTAG

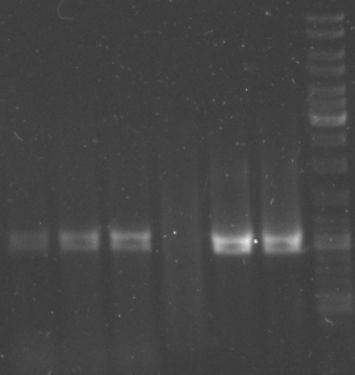
gb|CP003726.1 Enterococcus faecalis OG1RF …CCGAACGCTTAG

gb|CP002491.1| Enterococcus faecalis str. Symbioflor 1 …CCGAACGCTTAG

… \* \*\* \* \* \* \* \*\* \*\*\*

Определив консенсусные последовательности для каждого из генов лактатдегидрогеназы 1 и 2 , были подобраны праймеры для ПЦР-реакции этих генов.

На следующем этапе был амплифицирован ген лактатдегидрогеназы (LDG1 и LDG2). В качестве матрицы для ПЦР – реакции использовалась геномная ДНК бактериального штамма *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012. На рисунке представлена электрофореграмма ПЦР продукта гена LDG1 и LDG2, полученного с матричной ДНК E.faecalis БИМ-В1012



**1000 п.о.**

**1 2 3 4 5 6 7**

1 ( 9 нг/мкг), 2(26 нг/мкг), 3( 30 нг/мкг) – LDG2, 4 –отрицательный контроль, 5 ( 50 нг/мкг), 6 (45 нг/мкг) - LDG1, 7 -маркер молекулярного веса (1kb DNA Ladder)

Рисунок 3.1- Электрофореграмма ПЦР продукта гена LDG1 и LDG2, полученного с матричной ДНК *E.faecalis* БИМ-В1012.

Затем продукты амплификации были очищены для клонирования.

### 3.1.1 Подготовка вектора для клонирования продуктов амплификации

Клонирование продуктов амплификации может преследовать несколько целей: создание библиотеки, сохранение первичной последовательности для дальнейшей работы (секвенирования, мутагенеза и экспрессии генетического материала). Таким требованиям отвечает вектор pMTL21C, который и был нами выбран. Особенностью данного вектора является наличие только одного единственного сайта, который может быть применен для направленного клонирования - это сайт SmaI.

### 3.1.2 Трансформация штаммов E. coli XL1-Blue и E. сoli DH5 alpha вектором pMTL21C со вставкой ldg1

Для дальнейшей работы использовались продукты амплификации, полученные с матрицы штамма E.faecalis БИМ-В1012.

#### 3.1.2.1 Рестрикция плазмиды pMTL21C по сайту SmaI

Для дальнейшей работы необходимо было линиаризировать плазмиду pMTL21C, что осуществлялось с помощью рестриктазы SmaI.

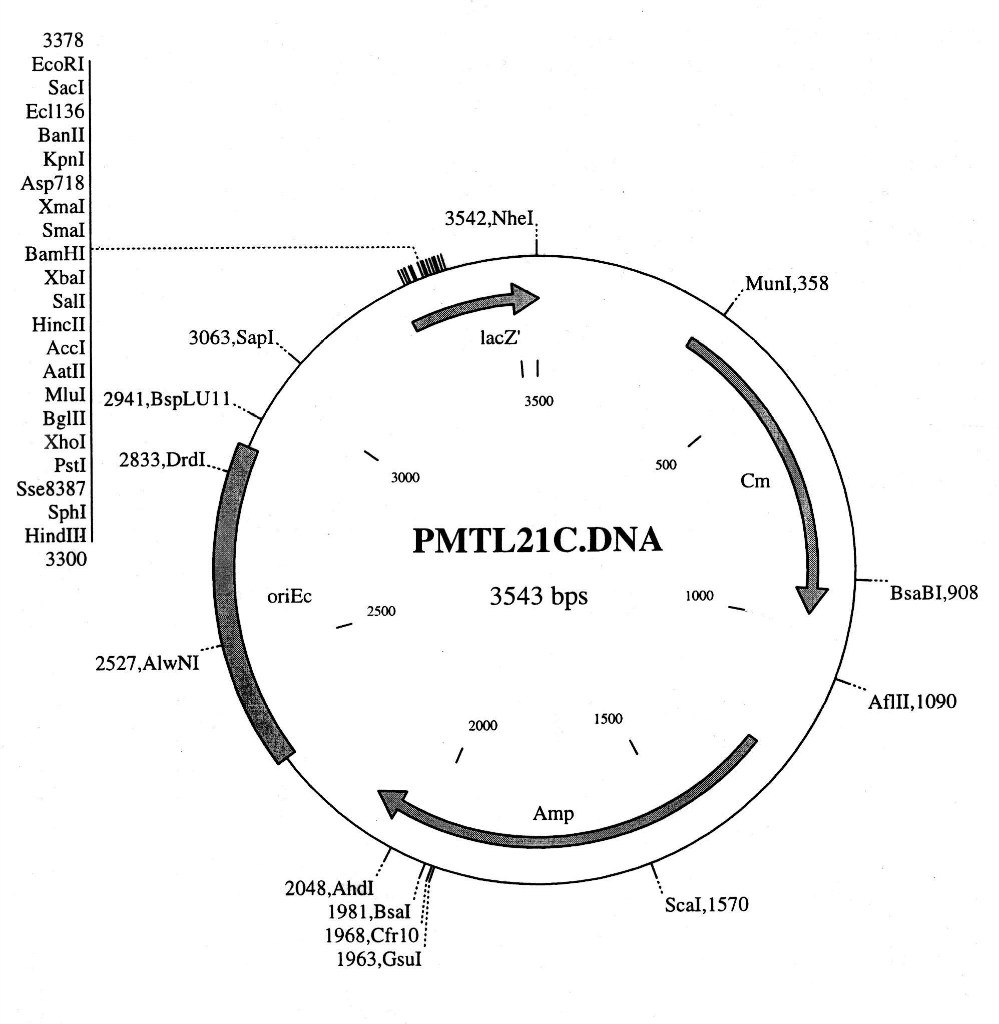
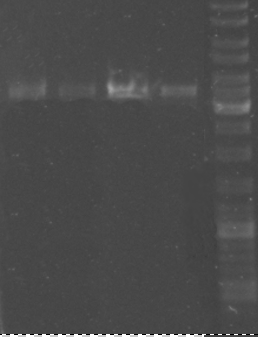


Рисунок 3.2 Карта плазмиды pMTL21C

Таблица 3.1 Протокол рестрикции:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование реагента | Исходная концентрация | Концентрация в конечном растворе | Объем реактива |
| ДНК | 120 нг/мкг | 240 нг/мкг | 2мкг |
| Буфер Blue | 10 X | 1X | 2,0 мкг |
| Рестриктаза SmaI | 10 ед./мкг | 1ед.(1X), | 0,2 мкг |
| H2O |  | до 20 мкг | 15,8мкг |



**1 2 3 4 5**

**3500 п.о.**

1 (14,39 нг/мкг), 2 (8,6 нг/мкг), 3 (30 нг/мкг), 4(15.3 нг/мкг) – рестрикция плазмиды pMTL21C по сайту SmaI, 5 - маркер молекулярного веса (1kb DNA Ladder)

Рисунок 3.3. Электрофореграмма рестрикции плазмиды pMTL21C по сайту SmaI

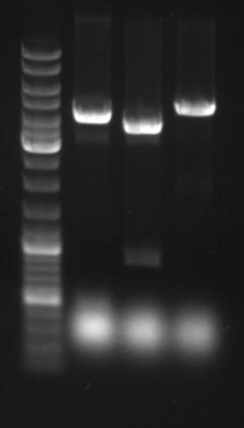
#### 3.1.2.2 Подготовка вектора pMTL21C и вставки LDG1 к лигированию

Полученные в ходе амплификации с матричной ДНК E.faecalis БИМ-В1012 ПЦР продукты лигировали с линиаризированной ДНК плазмиды pMTL21C.

Таблица 3.2 Протокол подготовки вектора и вставки к лигированию.

|  |  |
| --- | --- |
| *Реагенты* | *Количество* |
| 5х буфер для Т4 ДНК полимеразы | 4 мкг |
| ДНК (линейная или ПЦР продукт) | До 1µg |
| dNTP, 2 милиM каждого | 2 мкг |
| Т4 ДНК полимераза | 0,2 мкг(1ед.) |
| Вода | До 20 мкг |

Лигированной смесью трансформировалии бактериальный штаммы *E. coli* XL1-Blue *и E. сoli* DH5α, наилучшим образом подходящие для осуществления данного этапа работы. Селекцию вели на полноценной питательной агаризованной среде, содержащей ампициллин, в концентрации 100мкг/мл, хлорамфеникол, в концентрации 20 мкг/мл, X-Gal, IPTG. Из клонов трансформантов, имеющих характерную белую окраску, выделяли плазмидную ДНК и проверяли путем рестрикционного анализа по сайтам рестрикции EcoRI, PstI, HindIII. По результатом последнего были отобраны конструкции, размер которых соответствует ожидаемому.



**3500 п.о**

**1 2 3 4**

1 - маркер молекулярного веса (1kb DNA Ladder), 2 – HindIII, фрагмен 4000п.о., 3 – PstI фрагмент 4000п.о и 1000п.о, 4 - EcoRI, фрагмент 4400п.о.

Рисунок 3.4 Электрофореграмма пдрф-анализа одного из полученных трансформантов

## 3.2 Биоинформационный анализ последовательностей генов ldg1и ldg2

В ход анализа для определения пространственной структуры белков и его частичной характеристики использовались ранее полученные последовательности генов ldg1 и ldg2.

Этот этап работы осуществлялся при помощи биоинформационного анализа необходимых генов. Анализируя полученные данные, были расшифрованы первичные последовательности гена лактатдегидрогеназы 2-го типа и частично для мутантов M4, M5 и М6. С использованием программ BLASTP2.2.1[24] и ClustalW2[23] осуществлялась определение последовательностей, подвергшихся секвенированию. В результате экспериментальные последовательности были идентифицированы как гены лактатдегидрогеназ 2-типа, характерные для представителей *E. faecalis* (уровень идентичности более 95-99 %).

Характеристика генов лактатдегидрогеназы 1-го и 2-го типа проводилась с использованием программных ресурсов сервера Еxpasy пакета данных protparam.[25]

Было установлено число аминокислот для ЛДГ 1 и ЛДГ 2, , молекулярная масса, а также значение изоэлектрической точки. В таблице 3.8 приведены значения этих параметров для каждого белка.

Таблица 3.3 - Характеристика белков LDG1 и LDG2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Параметры | LDG1 | LDG2 |
| Число аминокислот | 327 | 317 |
| Изоэлектрическая точка | 4.77 | 4.79 |
| Масса | 35487.1 | 34368.1 |

С помощью программы uniprot[26] было установлено расположение белков в клетке и их пространственная структура. Как *LDG1*, так и *LDG2* являются цитоплазматическими и для обоих этих белков характерна гомотетрамерная структура.

С использованием алгоритма множественного выравнивания, было продемонстрировано, что общая структура гена лактатдегидрогеназы 2-го типа штамма *E. faecalis* БИМ B-1012имееттипичное строение для лактатдегидрогеназ *E. faecalis*, последовательности которых представлены в интегрированных и специализированных базах данных, на основе чего можно сделать вывод о сходстве лактатдегидрогеназы 1-го типа с таковыми лактатдегидрогеназами *E. faecalis* .

### 3.2.1 Вторичная структура лактатдегидрогеназ 1 и 2

Для дальнейшей характеристике лактатдегидрогеназ 1-го и 2- го типов осуществлялся анализ вторичной структуры. С помощью программы sopma[27] были получены сведения о вторичной структуре белков, представленные на рисунках 3.7 и 3.8.



Рисунок 3.5 Визуальное отображение вторичной структуры *LDG1*

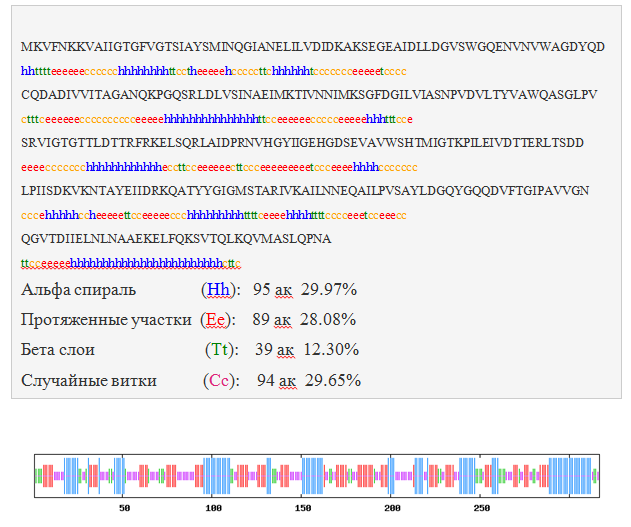


Рисунок 3.6 Визуальное отображение вторичной структуры *LDG2*

Из этих рисунков можно сделать заключение, что *LDG1* и *LDG2*сходны в организации вторичной структуры.

### 3.2.2 Четвертичная структура белков и их доменная организация

Кроме вторичной структуры, у белка также существует третичная и четвертичная пространственная структуры. Также следует помнить, что помимо пространственных структур существует ещё и доменная организация белков. Благодаря интернет-ресурсу smart [28] на рисунке 3.7 и 3.8 проиллюстрирована доменная организация LDG1 и LDG2. Программа supfam[29] помогла при характеристике доменной организации, результаты которой представлены в таблицах 3.4 и 3.5.

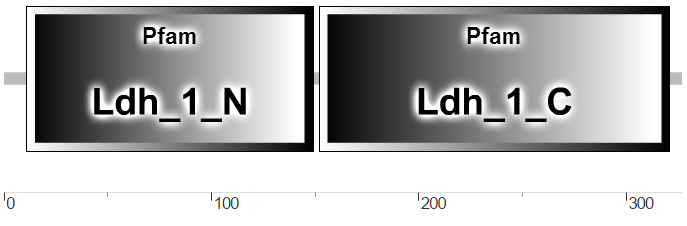


Рисунок 3.7 Доменная организация белка **LDG1**

Таблица 3.4 - Характеристика доменной организации белка LDG1

|  |  |
| --- | --- |
| **Сиквенс** | LDG1 |
| **Домен №1** | Регион :150-317 |
| **Суперсемейство** | [LDG C-концевой домен](http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=56327) |
| **Семейство** | С-терминальная лактат/малат дегидрогеназ |
| **Домен №2** | Регион**:** 7-151 |
| **Суперсемейство** | NAD(P)-связывающий домен |
| **Семейство** | N-терминальная лактат/малат дегидрогеназа |
| **Домен №3** | Регион 179 – 185 Активный центр лактатдегидрогеназы 1 типа |

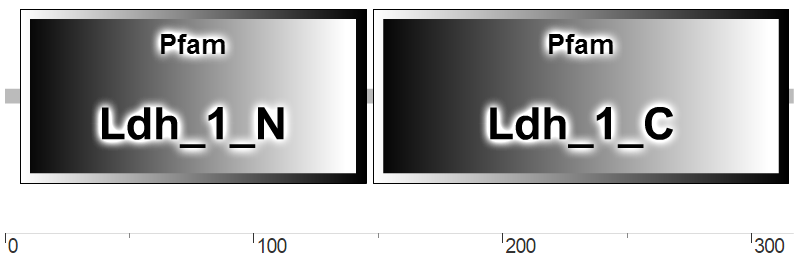


Рисунок 3.8 Доменная организация белка **LDG2**

Таблица 3.5 - Характеристика доменной организации белка LDG2

|  |  |
| --- | --- |
| **Сиквенс** | LDG2 |
| **Домен №1** | Регион : 146-313 |
| **Суперсемейство** | [LDG C-концевой домен](http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=56327) |
| **Семейство** | С-терминальная лактат/малат дегидрогеназ |
| **Домен №2** | Регион**:** 4-145 |
| **Суперсемейство** | NAD(P)-связывающий домен |
| **Семейство** | N-терминальная лактат/малат дегидрогеназа |
| **Домен №3** | Регион 175 – 181.  Активный центр лактатдегидрогеназы 2 типа |

Моделирование четвертичной структуры белков осуществлялось посредством программы swissmodel.еxpasy.[30] Ниже в иллюстрациях 3.9 и 3.10 представлены результаты.

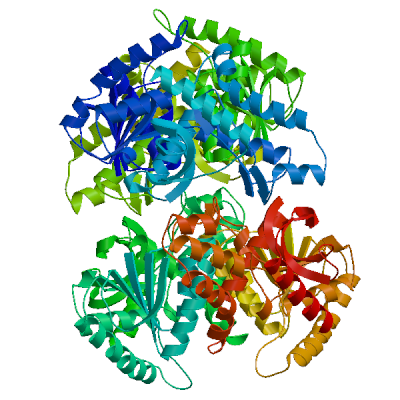


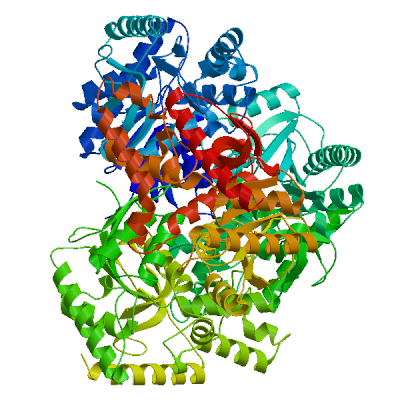
Рисунок 3.9 Четвертичная структура белка LDG1

Рисунок 3.10 Четвертичная структура белка LDG2

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности для генов   
L-лактатдегидрогеназ 1-го и 2-го типов и их аминокислотной последовательности генных продуктов указывает на не только сходство их структурной и пространственной организации, но и существенные отличия между лактатдегидрогеназами обоих типов. Выявляемая идентичность по аминокислотному составу составляет только около 44 %. Однако, не взирая на различия в аминокислотном составе, эти белки имеют гомотетрамерную структуру и оба локализованы в цитоплазме.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены консенсусные последовательности, на основе анализа которых были подобраны праймеры для амплификации генов лактатдегидрогеназ первого и второго типов штамма *E. faecalis* БИМ И-1012. Образованные продукты амплификации подготовлены для дальнейшего клонирования.

Была получена генетическая конструкция на основе вектора pMTL21C, содержащая ген *ldg1*, пригодная для изучения функциональной активности лактатдегидрогеназ первого типа.

Осуществлен анализ последовательности генов *LDG1* и  *LDG2* и детерминируемых ими продуктов штамма *E.faecalis БИМ В-1012*. Лактатдегидрогеназа этого штамма имеет типичное строение для лактатдегидрогеназ рода *Enterococcus*, представленным двумя типами. Не смотря на существенные различия в аминокислотной последовательности, для белков LDG1 и LDG2 предсказана сходная пространственная структура и локализация в клетке.

Для лактатдегидрогеназ 1-го и 2-го типов была предсказана пространственная структура гомотетрамера, локализованного в цитоплазме клетки.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грандберг, И.И. Органическая химия: Учебник для студентов вузов, обучающихся по агрономической специальности / И.И. Грандерг. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.:Дрофа, 2001. – 672с.
2. Нейланд, О.Я.Органическая химия: учеб. для хим. спец. вузов./ О.Я. Нейланд. – М.:Высш.шк., 1990. – 751с.
3. Органическая химия: учеб. лит. Для учащихся фарм. и мед. средних учеб. заведений/ А.П. Лузин [и др.]; под ред. Н.А. Тюкавкиной. – 2-е изд., перераб и доп. – М.:Медицина, 1998. – 496с.
4. Новый справочник химика и технолога: в 12 т./ редколл.: А.Столярова [и др.]. – Санк-Петербург: Профессионал, 2005. – Т. 3: Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Часть 2. / С.Н. Васильев [и др.]. – 2005. – 1142с.
5. Анализируй то, что ты ешь! Calorizator // E270 Молочная кислота [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: -http://www.calorizator.ru/addon/e2xx/e270 – Дата доступа: 20.04.2015.
6. Переработка молока // Применение молочной кислоты и лактатов [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: - http://www.milkbranch.ru/publ/view/198.htмл - Дата доступа: 21.04.2015.
7. Кроликовед //Лекарства против вздутия, тимпании, метеоризма кроликов – молочная кислота [Электронный ресурс]. – 2014 – Режим доступа: - http://krolikoved.ru/node/141 - Дата доступа: 21.04.2015
8. ФудТехИнвест // Молочная кислота [Электронный ресурс]. -2013. – Режим доступа: - http://fti.by/molochnaya-kislota – Дата доступа: 21.04.2015
9. Сервер издательского дома «Медицинский бизнес» // Установки для производства молочной кислоты Uhde [Электронный ресурс]. - Режим доступа: - http://www.medbusiness.ru/65.php - Дата доступа: 20.04.2015.
10. Лысак, В.В. Систематика микроорганизмов /В.В.Лысак, О.В. Фомина. – Минск: БГУ, 2014. – 304 с.
11. Способ получения молочной кислоты. пат. 2175014 Российской Федерации, C12P7/56, C12P7/56, C12R1:225 / Д.М. Исакова; заявитель Исакова Д.М. - № а 2000109701/13; заявл. 20.04.00; опубл. 20.10.01.
12. Lactic acid production from concentrated raw sugar beet juice: pat. NL, C12P 7/56 / D/ Visser, J. Van Breugel, J.M. De Bruijn, P. A'Campo; Purac Biochem BV - № 8211675; filed 22.06.07; date issued: 03.07.12.
13. Method for the production of lactic acid or a salt thereof by simultaneous saccharification and fermentation of starch: pat NL, C12P 7/56; C12P 7/00; C12P 1/00; C12N 1/12; C12P 7/40 / R. Otto; Purac Biochem B.V. - № 8119376; filed 13.05.03; date issued 21.02.12.
14. Production of lactic acid from fermentations using mixed bacterial cultures, pat. China, PCT/CN2012/076993 / Fengjie Cui; Jiangsu University - № WO2013185344 A1, field 15.06.12; date issued 19.12.13.
15. Low PH lactic acid fermentation: pat. USA, US 08/949,420 / Ting Liu Carlson, Eugene Max Peters; Cargill, Inc. - № US 6475759 B1; field 14.10.97; date issued 05.11.02.
16. Штамм молочнокислых бактерий lactobacillus delbrueckii - продуцент молочной кислоты, пат. 2283345 Российской Федерации, C12N1/20, C12P7/56 / А.П. Бочкова, В.В. Евелева; заявитель Гос. учрежд. Всерос. научно-исслед. инсти. пищ. ароматизаторов, кислот и красителей Российской академ. селскохоз. наук - № а 2283345; заявл. 14.10.04; опубл. 10.09.06.
17. Штамм бактерий enterococcus faecium в-2240d - продуцент оптически чистой l(+)-молочной кислоты и промышленный способ получения l(+)-молочной кислоты или ее солей, пат. Российской Федерации, С12R/01 C12N1/20 / Г.В. Галкина, В.И.Илларионова, заявитель Г.В. Галкина, В.И. Илларионова - № 2205216; заявл. 10.10.00; опублик. 27.04.03.
18. Рекомбинантный штамм дрожжей Schizosaccharomyces pombe – продуцент молочной кислоты, пат. Российской Федерации 2539092, C12P7/56 C12N1/19 / С.П. Синеокий, Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, заявит. Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов", заявл. 30.10.13, опублик.13.12.13.
19. Штамм Bacillus coagulans SIM-7 DMS 14043 для получения I(+)- лактата и способы получения I(+)- лактата, пат. Эстонии, C12P7/56 C12N1/20 / Я. Симискер, А. Нурк, А. Хейнару, заявит. Тартусский университет, № а 2288263, опубл. 27.11.06.
20. Маниатис ,Т. Методы генетической инженерии / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. // Молекулярное клонирование. Москва. «Мир», 1984– 436 с.
21. Joseph, P. Raid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in Bacillus subtilis./ P.Joseph, J.-R. Fantino, M.-L. Herbaud // FEMS Microbiology Letters 205 – 2001 – P. 91-97.
22. Yusuf М, Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin Producer/ Moshood A. Yusuf, Tengku Haziyamin Abdul Tengku Abdul Hamid. – 2013 - IOSR Journal Of Pharmacy - v3, № 4 - p 44-50.
23. Multiple Sequence Alignment[Electronic resource/The European Bioinformatics Institute,Part of the European Molecular Biology Laboratory, 2016 - Mode of access: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ - Date of access: 23.05.2016.
24. National Center for Biotechnology Information[Electronic resource]/ National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine - Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov- Date of access: 23.05.2016.
25. Bioinformatics resourse Portal [Electronic resource]/ SIB Swiss Institute of Bioinformatics. - Mode of access: http://www.expasy.org - Date of access: 23.05.2016.
26. Uniprot datebase [Electronic resource]/ UniProt Consortium, 2002 . - Mode of access: http://www.uniprot.org - Date of access: 23.05.2016.
27. Institute of Biology and Protein Chemistry [Electronic resource]/Copyright PBIL – IBCP-Lyon, 2016 - Mode of access: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\_sopma.htмл - Date of access: 23.05.2016.
28. Simple Modular Architecture Research Tool SWI[Electronic resource] / Schultz et al.-Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1995 - Mode of access: http://smart.embl-heidelberg.de - Date of access: 23.05.2016.
29. HMM libraryand genome assignments server [Electronic resource]/ The SUPERFAMILY authors and Julian Gough, 2013. - Mode of access: http://supfam.org/SUPERFAMILY/index.htмл - Date of access: 23.05.2016.
30. SWISS - MODEL [Electronic resource]/ Swiss Institute of Bioinformatics - Mode of access: http://swissmodel.expasy.org - Date of access: 23.05.2016.
31. Taylor R.G., Walker D.C., McInnes R.R. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing // Nucleic Acids Res – 1993. Vol. 21. № 7. – P. 1677-1678.
32. Bullock W.O., Fernandes J.M., Short J.M. // BioTechniques – 1987. – Vol. 5. – P. 376–379.
33. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. The pMTL nic- cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing // Gene. – 1988. – Vol. 68, № 1. – P. 139–149.