

УДК 579.672

**ПОЛУЧЕНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИЙ *АСЕТОВАСТЕР*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СУБСТРАТА ЧАЙНОГО ГРИБА**

К.А. Головач, 3 курс

Научный руководитель – **Н.В. Водчиц**, заведующий ОЛ «ДНК и клеточных технологий
в растениеводстве и животноводстве»

Полесский государственный университет

Уксусная кислота (этановая) – представляет собой органическое соединение, относящееся к слабым, предельным карбоновым кислотам. У нее выраженный специфичный запах и резкий ха-

рактерный вкус. В живых организмах данное вещество занимает ключевую позицию в углеводном обмене и многочисленных биохимических реакциях [4, с. 606–607].

Для получения пищевой уксусной кислоты широко используются уксуснокислые бактерии, которые обладают уникальной способностью окислять этиловый спирт с помощью фермента алкогольоксидазы. Типичным представителем является *Acetobacter aceti* [2, с. 8].

Чайный гриб представляет собой симбиоз микроорганизмов, образованный несколькими видами дрожжевых грибов и бактерий. Согласно литературным данным, его микрофлора насчитывает более 22 видов микроорганизмов. В первую, доминирующую группу, входят уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*. Вторую группу составляют молочнокислые бактерии (преимущественно *Lactobacillus acidophilus*), а третью — дрожжи (в частности, вид *Saccharomyces ludwigii*) [5, с. 23].

Целью данной работы является получение уксусной кислоты с помощью бактерий *Acetobacter*, выделенных в условиях учебной лаборатории из чайного гриба.

Исследования проводились в микробиологической лаборатории УО «Полесский государственный университет». Объектами исследования являлись: уксуснокислые бактерии, выделенные из субстрата чайного гриба, а также уксусная кислота, полученная с их помощью в процессе ферментации.

Для выделения *Acetobacter* отбирали жидкость, в которой находился чайный гриб, и переносили на селективную среду, обогащенную уксусной кислотой [5, с. 24]. С целью точной идентификации уксуснокислых бактерий был выполнен посев на дифференциально-диагностическую среду GYC [1].

Способность полученной культуры *Acetobacter* окислять спирты до уксусной кислоты и ее накапливать оценивали на синтетической среде Лойцянской в трех повторностях. Жидкие селективные среды засеивали 3-суточной культурой бактерий, в процессе культивирования ежедневно вносили по 3 капли 96%-го этилового спирта. Инкубацию проводили в течение 7 суток при температуре 30 °C [2, с. 8].

Наличие уксусной кислоты в культуральной жидкости устанавливали на основании динамики показателей кислотности и при помощи качественной реакции. К 10 мл фильтрата добавляли 2 капли фенолфталеина и нейтрализовывали раствором карбоната натрия до появления устойчивой бледно-розовой окраски. Затем добавляли раствор хлорида железа (III) для образования ацетата железа (III) [2, с. 9].

На поверхности селективной среды, содержащей чайный гриб, наблюдалось формирование тонкой нежной пленки, которая по мере нарастания опускалась на дно в виде хлопьевидного осадка [2, с. 6].

Для подтверждения присутствия уксуснокислых бактерий на данной среде была выполнена окраска по Граму [3, с. 29].

При микроскопировании выявлены грамотрицательные (окрашенные в красный цвет) мелкие клетки цилиндрической формы, расположенные в виде цепочек или попарно (Рисунок 1).

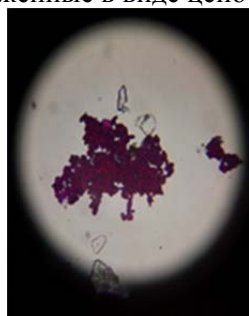


Рисунок 1. – Бактерии из чайного гриба под микроскопом (увеличение 1000х)

С целью точного подтверждения полученных результатов был выполнен посев на дифференциально-диагностическую среду GYC, которая является селективной средой для *Acetobacter*, и обеспечивает рост и развитие исключительно этих микроорганизмов [1]. Пробу культуральной жидкости распределяли по поверхности плотной среды в чашках Петри и выдерживали в термостате при 28 °C в течение 72 часов. [1, с. 60].

В ходе культивирования на поверхности среды был отмечен рост колоний (Рисунок 2).



Рисунок 2. – Колонии уксуснокислых бактерий на среде GYC

Для получения уксусной кислоты проводили пересев полученной культуры в три колбы со средой Лойцянской. Среда обеспечивает микроорганизмы всеми необходимыми минеральными веществами, а источником углерода служит этиловый спирт, добавляемый ежедневно в количестве 0,2–0,5 % от объема [2, с. 9].

Через неделю на поверхности трех сред было зафиксировано формирование сплошной беловатой пленки, появился специфический кислый запах, что свидетельствовало о росте ацетобактерий. Накопившуюся биомассу отделяли фильтрованием и определяли pH. Значения показателей снижались с исходных 6,7 до 5,5, что свидетельствует об активном протекании процесса кислотообразования.

С фильтратами, полученными из трех колб, проводили качественную реакцию взаимодействия уксусной кислоты с хлоридом железа (III). При положительном результате образуется красное-бурое окрашивание (Рисунок 3).



1 – фильтрат, выделенный из первой колбы; 2 – фильтрат, выделенный из второй колбы; 3 – фильтрат, выделенный из третьей колбы

Рисунок 3. – Качественная реакция на присутствие уксусной кислоты

Во всех образцах произошло изменение цвета, обусловленное образованием ацетата железа (III).

На основании изученных морфологических и культуральных свойств, выделенные из субстрата чайного гриба, микроорганизмы были идентифицированы как уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*.

Согласно результатам тестов: изменение pH среды и получение солей ацетата железа (III), было определено, что изолированные бактерии способны окислять этиловый спирт до уксусной кислоты.

Список использованных источников

1. Боиштян, А. В. Выявление оптимального источника для изолирования уксуснокислых бактерий / А. В. Боиштян [и др.] // Труды Технического Университета Молдовы. – 2022. – № 55. – С. 59–62.
2. Волкова, Е. М. Селекция продуцентов : метод. рекомендации к выполнению лабораторных работ для студентов специальности 1-31 01 01 Биология / Е. М. Волкова. – Пинск : ПолесГУ, 2016. – 21 с.
3. Лабораторный практикум по микробиологии : учеб. пособие / Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2005. – 112 с.

4. Рыбалка, А. А. Роль уксусной кислоты для здоровья человека / А. А. Рыбалка, А. П. Алексеев // Академическая публицистика. – 2021. – № 5. – С. 606–610.

5. Шокатаева, Д. Х. Популяционно-генетическая и экологическая структура вида. Изолирование бактерий вида *Komagataeibacter* – продуцента бактериальной целлюлозы из микробиоценоза чайного кваса / Д. Х. Шокатаева [и др.] // Биологический вид в структурно-функциональной иерархии биосферы : сб. материалов XV Междунар. науч. -практ. экол. конф. – Белгород, 2018. – С. 23–26.