

Научная статья

УДК 579.66

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254>

EDN: HUHAE



## Исследование характеристик роста штаммов-продуцентов молочной кислоты с использованием глюкозного сиропа в качестве источника углерода

А.А. Суханова, Н.Л. Ертилецкая✉, А.Н. Бояндин, С.Н. Сырцов, А.А. Середа, Ю.А. Прокопчук, В.В. Бротт

Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
г. Красноярск, Российская Федерация

**Аннотация.** В работе исследованы характеристики роста и продуктивности штаммов-продуцентов молочной кислоты *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 (ВКПМ В-2368), *Lactobacillus acidophilus* 5 Дс (ВКПМ В-2846) и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ВКМ В-1662) на стандартной среде MRS с использованием глюкозного сиропа в качестве углеродного субстрата. По результатам периодического культивирования выбранных штаммов в ферментерах объемом 5 л в течение 72 ч было установлено, что продуктивность снижается в ряду *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 > *Lactobacillus acidophilus* 5 Дс > *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Максимальную продуктивность по молочной кислоте 1,94 г/(л×ч) показал *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 с соответствующей степенью конверсии глюкозы 87%. После культивирования отмечено незначительное снижение содержания азота, калия и натрия в культуральной жидкости исследуемых штаммов-продуцентов. Содержание остальных макроэлементов (фосфора, кальция, серы, магния, бария и железа) для всех штаммов повысилось пропорционально добавлению глюкозного сиропа в ходе культивирования, что непосредственно связано с их значительным содержанием в его составе. Штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 и *Lactobacillus acidophilus* 5 Дс продуцировали рацемическую (DL)-молочную кислоту, в то время как штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* продуцировал молочную кислоту с содержанием L-изомера 73%. Использование глюкозного сиропа в биотехнологических процессах может способствовать внедрению безотходного производства на соответствующих предприятиях.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, периодическое глубинное культивирование, молочная кислота, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*

**Финансирование.** Проект «Исследование механизмов биодegradации образцов изделий на основе полилактида для прогнозирования скорости биодеструкции упаковочных изделий и тары в различных климатических условиях», № 2022110309011 поддержан Красноярским краевым фондом науки.

**Для цитирования:** Суханова А.А., Ертилецкая Н.Л., Бояндин А.Н., Сырцов С.Н., Середа А.А., Прокопчук Ю.А., Бротт В.В. Исследование характеристик роста штаммов-продуцентов молочной кислоты с использованием глюкозного сиропа в качестве источника углерода // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 2. С. 245–254. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254>. EDN: HUHAE.

### PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY

Original article

## Growth characteristics of lactic acid-producing strains using glucose syrup as a carbon source

Anna A. Sukhanova, Natalya L. Ertiletskaya✉, Anatoly N. Boyandin,  
Sergey N. Syrtsov, Anna A. Sereda, Yulia A. Prokopchuk, Valeria V. Brott

Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** This work investigates the growth and productivity characteristics of such lactic-acid producing strains, as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 (VKPM B-2368), *Lactobacillus acidophilus* 5 Ds (VKPM B-2846) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (VKM B-1662) on standard MRS medium using glucose syrup as a carbon substrate. According to the results of batch cultivation of the selected strains in 5L fermenters for 72 h, the productivity was established to decrease in the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 > *Lactobacillus acidophilus* 5 Ds > *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* series. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 showed the maximum lactic-acid productivity of 1.94 g/(l×h) with a glucose conversion degree of 87%. After cultivation, a

© Суханова А.А., Ертилецкая Н.Л., Бояндин А.Н., Сырцов С.Н., Середа А.А., Прокопчук Ю.А., Бротт В.В., 2023

slight decrease in the content of nitrogen, potassium and sodium in the culture liquid of the studied strains was observed. In all strains, the content of other macronutrients (phosphorus, calcium, sulphur, magnesium, barium and iron) increased in proportion to the addition of glucose syrup during cultivation, which is directly related to their significant content in its composition. The *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 and *Lactobacillus acidophilus* 5 Ds strains produced racemic (DL) lactic acid, whereas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produced lactic acid with a 73% L-isomer content. The use of glucose syrup in biotechnological processes can contribute to the implementation of waste-free production in the respective enterprises.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, batch submerged cultivation, lactic acid, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*

**Funding.** Project «Research of biodegradation mechanisms of polylactide samples for prediction of biodegradation rate of packaging materials in various climates», № 2022110309011 was supported by Krasnoyarsk Regional Fund of Science.

**For citation:** Sukhanova A.A., Ertiletskaya N.L., Boyandin A.N., Syrtsov S.N., Sereda A.A., Prokopchuk Yu.A., Brott V.V. Growth characteristics of lactic acid-producing strains using glucose syrup as a carbon source. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(2):245-254. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254>. EDN: HIUNAE.

## ВВЕДЕНИЕ

Молочная кислота (2-гидроксипропановая кислота) (МК) является важным сырьем пищевой (до 85%) и непищевой (до 15%) промышленности. В промышленных масштабах МК можно синтезировать двумя способами: химическим путем и микробной ферментацией. Второй способ наиболее предпочтителен и реализуем на производстве.

Среди продуцентов молочной кислоты выделяют бактериальные (в основном молочнокислые бактерии (МКБ) родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* и др.) и грибные штаммы (*Rhizopus*), некоторые виды дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*). Бактериальные продуценты молочной кислоты, или МКБ, отличаются тем, что имеют относительно короткую по сравнению с грибами лаг-фазу, благодаря чему продукция молочной кислоты начинается менее чем через 12 ч культивирования, а также имеют высокие показатели конверсии и меньшее время ферментации. Однако стоит учитывать необходимость строгого поддержания асептики при культивировании МКБ, т.к. бактериальные культуры чувствительны к контаминации. Анализ литературных данных показал, что из бактериальных продуцентов молочной кислоты выделяют такие виды, как *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, а также *Lactococcus lactis* [1–3]. Производство молочной кислоты *Lactobacillus* основано на сбраживании ценных сахаросодержащих субстратов, что значительно отражается на себестоимости конечного продукта [4]. Среди субстратов выделяют глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, ксилозу, арабинозу, мелассу и различные гидролизаты [5–7]. Известно, что *L. paracasei* могут расти на питательных средах MRS, содержащих глюкозу, сахарозу и мелассу. Штамм *Lactobacillus casei* C-1 (B-5726) способен ферментировать лактозу, содержащуюся в молочной сыворотке [8]. Гетероферментные культуры *Lactobacillus plantarum* 1058 и *L. bulgaricus* 1332 способны использовать в качестве источников углерода простые сахара. Однако выход МК на среде с глюкозой в 1,4–2,3 раза больше, чем на средах с сахарозой, лактозой, мальтозой, ксилозой и арабинозой [9]. В случае использования комплексных субстратов (ги-

дроллизатов, патоки, сиропов) выходы МК составляют от 30 до 50 г/л по разным источникам [6, 10]. Помимо редуцирующих веществ, в составе таких субстратов необходимо учитывать наличие примесей в виде макро- и микроэлементов, что также может повлиять на процесс ферментации и дальнейшую очистку молочной кислоты.

Кроме источника углерода, немаловажными факторами являются источники азота, pH, температура и способ культивирования, которые могут влиять на количество культуры и ее продуктивность. Среди азотсодержащих органических веществ выделяют растительные, животные, дрожжевые гидролизаты и экстракты – необходимые компоненты комплексных питательных сред для культивирования МКБ. *Lactobacillus* весьма требовательные к составу среды, наличию аминокислот, витаминов и других факторов роста, ограниченное количество которых способно снижать исходную активность бактерий.

Ввиду широкого круга сфер использования МК, особое значение имеет ее энантиомерная чистота и понимание соотношения L- и D-изомеров, что в дальнейшем определяет ее применение. В пищевой промышленности применение рацематов нежелательно из-за плохой усвояемости D-молочной кислоты организмом, а в полимерной промышленности использование рацемата затрудняет получение кристаллического полилактида [11, 12]. Соотношение изомеров в МК напрямую зависит от штамма-продуцента и обусловлено его ферментативной системой [13].

Целью данного исследования было сравнение продуктивности штаммов-продуцентов молочной кислоты *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 (ВКПМ В-2368), *Lactobacillus acidophilus* 5 Дс (ВКПМ В-2846) и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ВКМ В-1662) при периодическом глубинном культивировании с использованием глюкозного сиропа в качестве углеродного субстрата. Данный субстрат перспективен, т.к. является продуктом гидролиза растительного крахмалосодержащего сырья.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования проанализированы 3 штамма-продуцента молочной кислоты: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

19-11 (ВКПМ В-2368) (далее – *L. delbrueckii*), *Lactobacillus acidophilus* 5 Дс (ВКПМ В-2846) (далее – *L. acidophilus*) и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ВКМ В-1662) (далее – *L. lactis*). Штаммы *L. delbrueckii* и *L. acidophilus* 5 Дс приобретены во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Штамм *L. lactis* был предоставлен коллегами из Университета ИТМО. Для культивирования бактерий использовали стандартную питательную среду MRS [14] следующего состава: дрожжевой экстракт – 4 г/л, мясной экстракт/пептон – 10 г/л, гидролизат казеина – 10 г/л, цитрат аммония (двузамещенный) – 2 г/л, ацетат натрия – 5 г/л,  $K_2HPO_4$  – 2 г/л,  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  – 0,20 г/л,  $MnSO_4 \times 4 H_2O$  – 0,05 г/л, углеводы – 20 г/л. Готовую среду стерилизовали в паровом стерилизаторе ВК-75 (АО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия) при 0,5 атм 30 мин.

В качестве источника углеводов использовали глюкозный сироп (ГС), получаемый из крахмала АО «Аминосиб» (г. Ишим, Тюменская область, Россия). Входной контроль сырья включал определение декстрозного эквивалента ГС по методике, описанной в ГОСТ Р 50549-93<sup>1</sup>, и исследование элементного состава ГС с помощью эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 Duo (Thermo Scientific, США) согласно ЕРА. По данным производителя, ГС содержал сухого вещества от 30–32%, декстрозный эквивалент 95%, глюкозу 95%, высшие сахара макс. 5%.

Инокулят для каждого продуцента получали в асептических условиях из 3-х пробирок с рабочей культурой, выращенной на полужидкой среде MRS, и предварительно культивировали в колбах с 500 мл жидкой стерильной питательной среды MRS на шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия) в течение 12 ч. Полученный инокулят с концентрацией клеток порядка  $10^7$  КОЕ/л асептически переносили в ферментер объемом 5 л Sartorius Biostat Aplus (Biostat, Германия) с 2,8 л стерильной жидкой среды MRS. Концентрацию клеток определяли путем прямого подсчета клеток в камере Горяева 0,1 мл инокулята с последующими расчетами. Культивирование проводили в течение 72 ч при температуре 40 (для *L. delbrueckii* и *L. acidophilus*) или 32 °С (для *L. lactis*) и оборотах мешалки 150 об/мин. pH поддерживали на уровне 4,0–6,5 путем добавления карбоната кальция в качестве нейтрализующего агента в количестве 4% на этапе приготовления питательной среды для ферментера, а также добавлением его в процессе культивирования по мере необходимости. Для поддержания оптимальной концентрации глюкозы 20 г/л при ее снижении периодически добавляли ГС. Далее сразу после загрузки инокулята в ферментер и в дальнейшем через каждые 4 ч асептически проводили отбор проб культуральной жидкости для определения оптической плотности, концентрации клеток (через каждые 12 ч), концентрации глюкозы и молочной кислоты. По окончании культивирования определяли элементный состав культуральной жид-

кости, а также использовали ее для определения стереоизомера молочной кислоты.

Изменение биомассы клеток в процессе развития культуры регистрировали оптическими показателями культуры. 1 мл культуральной жидкости разводили 5 мл дистиллированной воды и перемешивали. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 440 нм против воды, определяя абсолютное значение по калибровочному графику<sup>2</sup>. Концентрацию глюкозы в культуральной жидкости устанавливали фотометрическим методом с использованием готового набора «Глюкоза ФКД» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия) согласно инструкции. Концентрацию молочной кислоты определяли фотометрическим методом по методике, описанной Борщевской и др. [15]. Для калибровки использовали водные растворы молочной кислоты с известной концентрацией. Концентрацию биомассы определяли весовым методом, высушивая отмытые клетки навески при температуре 105 °С до постоянной массы.

Сравнительные показатели роста штаммов-продуцентов молочной кислоты определяли по следующим формулам:

1) продуктивность культуры за промежуток времени  $dt$  (в г/(л×ч):

$$Y_p = dP/dt, \quad (1)$$

где  $dP$  – концентрация молочной кислоты (г/л) в момент времени  $t$  (в г/(л×ч);

2) скорость потребления субстрата культурой в данный момент:

$$Y_s = dS/dt, \quad (2)$$

где  $dS$  – количество потребленной глюкозы в пересчете на объем культуральной среды (в г/л) в момент времени  $t$ ;

3) степень конверсии субстрата (в %):

$$C_s = \Delta S / \Delta P \times 100\%, \quad (3)$$

где  $\Delta S$  и  $\Delta P$  – потребление субстрата и продуктивность за все время культивирования соответственно.

Содержание микро- и макроэлементов в исходной питательной среде и конечных культуральных жидкостях определяли так же, как и для ГС. Для анализа пробы разводили в 100 раз и подкисляли соляной кислотой (ООО «Сигма Тэк», Россия) в соотношении 1:100. Калибровка прибора выполнена с использованием многоэлементных стандартов Merck (Германия) и Fluka (Швейцария), одноэлементных стандартов фосфора (CGP10) и магния (CGMG10) Inorganic ventures (США), а также  $CaO$  и  $Na_2SO_4$  (ос.ч.). В качестве внутреннего стандарта использовали скандий (5 мг/л) (Fluka, Швейцария).

Соотношение L- и D-изомеров молочной кислоты в конечной культуральной жидкости определяли по

<sup>1</sup> ГОСТ Р 50549-93. Продукты гидролиза крахмала. Определение восстанавливающей способности и эквивалента глюкозы. Метод постоянного титра Лейна и Эйнона. М.: Госстандарт России, 1993. 11 с.

<sup>2</sup> Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Сински Э.Дж. Современные аппаратура и методы исследования биологических систем. Большой практикум: учеб. пособие. Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2013.



модифицированной методике, описанной в [16], после дериватизации  $\alpha$ -ментолом.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам культивирования 3-х штаммов-продуцентов молочной кислоты на ГС в ферментере объемом 5 л установлены различия в потреблении субстрата и продуктивности МКБ (табл. 1). Определенный декстрозный эквивалент использованного ГС составил 98,4%, что несколько превысило паспортные данные, также отмечено повышенное по сравнению с другими элементами содержание (от 0,5 до 2,5%) таких микроэлементов, как сера, натрий, фосфор, кальций, калий и магний (данные не приведены).

Исследования основных характеристик роста в лаг-фазе при культивировании штаммов-продуцентов показали, что у МКБ *L. lactis* она практически отсутствует по сравнению с *L. delbrueckii* и *L. acidophilus*. Стоит отметить, что при одинаковой скорости потребления субстрата в данной фазе продуктивность *L. delbrueckii* и *L. acidophilus* различалась в 3,4 раза, что, скорее всего, связано со способностью *L. delbrueckii* быстрее адаптироваться к условиям культивирования.

При сравнении штаммов-продуцентов в экспоненциальной фазе отмечено, что для *L. delbrueckii* она составляет 12 ч и менее длительна, чем для других продуцентов. Максимальная скорость потребления субстрата зарегистрирована для *L. acidophilus* (5,77 г/(л×ч)), тогда как у *L. delbrueckii* и *L. lactis* аналогичный показатель составил 3,53 и 2,31 г/(л×ч) соответственно. По продукции МК *L. acidophilus* и *L. delbrueckii* были сопоставимы (5,80 г/(л×ч)) и в 4 раза превышали данный показатель у *L. lactis*.

Длительность стационарной фазы *L. lactis* составила 52 ч, *L. delbrueckii* и *L. acidophilus* – 48 и 40 ч соответственно. Скорость потребления субстрата в данной фазе значительно снизилась, так же как и продуктивность МК, которая составила 1,07; 0,75 и 0,49 г/л соответственно для *L. lactis*, *L. delbrueckii* и *L. acidophilus*.

По окончании культивирования общее потребление глюкозы за 72 ч для *L. acidophilus* составило 189,9 г/л, для *L. delbrueckii* – 151,7 г/л, для *L. lactis* – 64,7 г/л. Степень конверсии для данных продуцентов находилась в пределах от 67 до 87%. Несмотря на выход МК 51,6 г/л для *L. lactis*, что в 2,4 раза меньше других продуцентов, его степень конверсии была выше, чем у *L. acidophilus*. Данный показатель может оказать определенное влияние при масштабировании процессов культивирования. Среди исследованных продуцентов максимальной производительностью обладает *L. delbrueckii* с выходом МК до 132 г/л.

При сравнении полученных данных с опубликованными исследованиями обнаружены различия в показателях. В работе Бочковой и др. [17] при молочнокислом брожении *L. delbrueckii* ВКПМ В-8744 на среде с концентрацией сахара 120–130 г/л общая продуктивность процесса составила 2,92–2,96 г/(л×ч), выход молочной кислоты на стадии брожения – 94–95%, коэффициент биоконверсии сахара – 0,96. Это в 1,5 раза выше, чем показатели *Lactobacillus delbrueckii* на ГС. Однако в работе Шавыркиной и др. (2021) при культивировании *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 21В на нативном ферментативном водном гидролизате технической целлюлозы плодовых оболочек овса выход молочной кислоты составил 76,7%, что более чем на 10% меньше, чем при культивировании *L. delbrueckii* на глюкозном сиропе [18].

Полученные показатели роста *L. acidophilus* на ГС были несколько выше, чем в исследовании Шиповской и др. [2] при культивировании *L. acidophilus* на молочной сыворотке. Зарегистрированная скорость образования и выхода целевого продукта составили 0,78 г/(л×ч) и 79,96% соответственно.

По данным исследования Илушки и соавторов [3], при сравнении штаммов МКБ *L. lactis* CH5, *Lactobacillus helveticus* В-4040 и *L. delbrueckii* А 20 на стандартной MRS с глюкозой наиболее перспективным продуцентом МК стал штамм *L. lactis* CH5, про-

Таблица 1. Сравнительные показатели роста штаммов-продуцентов молочной кислоты

Table 1. Comparative growth rates of lactic acid-producing strains

Наименование показателя	Штаммы-продуценты		
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i>
Продолжительность лаг-фазы, ч	12	12	4
Скорость потребления субстрата в лаг-фазе, г/(л×ч)	0,34	0,35	–
Продуктивность в лаг-фазе, г/(л×ч)	1,31	0,38	–
Продолжительность экспоненциальной фазы, ч	12	20	20
Скорость потребления субстрата в экспоненциальной фазе, г/(л×ч)	3,53	5,77	2,31
Продуктивность в экспоненциальной фазе, г/(л×ч)	5,77	5,80	1,45
Продолжительность стационарной фазы, ч	48	40	52
Скорость потребления субстрата в стационарной фазе, г/(л×ч)	2,39	1,98	0,39
Продуктивность в стационарной фазе, г/(л×ч)	1,07	0,75	0,49
Потребление глюкозы, г/л	151,7	189,9	64,7
Концентрация биомассы, г/л	3,62	2,0	0,95
Выход молочной кислоты, г/л	132,0	127,3	51,6
Продуктивность, г/(л×ч)	1,94	1,87	0,76
Степень конверсии, %	87,0	67,0	79,7

дуктивность которого оказалась в 2 раза выше, чем у использованных в работе лактобацилл, – до 90 г/л, при этом количество потребляемой глюкозы составило 115 г/л, что в принципе коррелирует с приведенными в данной статье показателями.

Для понимания влияния макро- и микроэлементов, содержащихся в среде и в ГС, используемом для подпитки, на рост МКБ были проанализированы образцы культуральной жидкости до и после культивирования (табл. 2).

По данным табл. 2, после 72 ч культивирования отмечено незначительное снижение содержания азота, калия и натрия в культуральной жидкости исследуемых штаммов-продуцентов. Содержание остальных макроэлементов (фосфора, кальция, серы, магния, бария и железа) для всех штаммов повысилось пропорционально добавлению ГС в ходе культивирования, что непосредственно связано с их значительным содержанием в составе ГС.

Увеличение кальция было обусловлено включением его значительного содержания в состав ГС и непосредственным внесением карбоната кальция во время культивирования для нейтрализации pH. Данные табл. 2 коррелируют с данными, представленными в табл. 1. Известно, что одна молекула  $\text{Ca}^{2+}$  с молекулярной массой 40 г/л используется на нейтрализацию 2-х молекул МК ( $\text{CH}_3\text{-CHON-COO}$ )<sub>2</sub> с молекулярной массой 178 г/л. На примере *L. delbrueckii* количество кальция в культуральной жидкости по окончании ферментации составило порядка 20 г/л, тогда как МК должно быть не менее 89 г/л.

Результаты хроматографического анализа ментоловых эфиров молочной кислоты, содержащейся в культуральной жидкости исследованных штаммов, показаны на рисунке. Установлено, что *L. delbrueckii* производит рацемат молочной кислоты, доля L-изомера в котором варьировалась в пределах 44,92–48,75%. *L. acidophilus* также продуцирует рацемат молочной

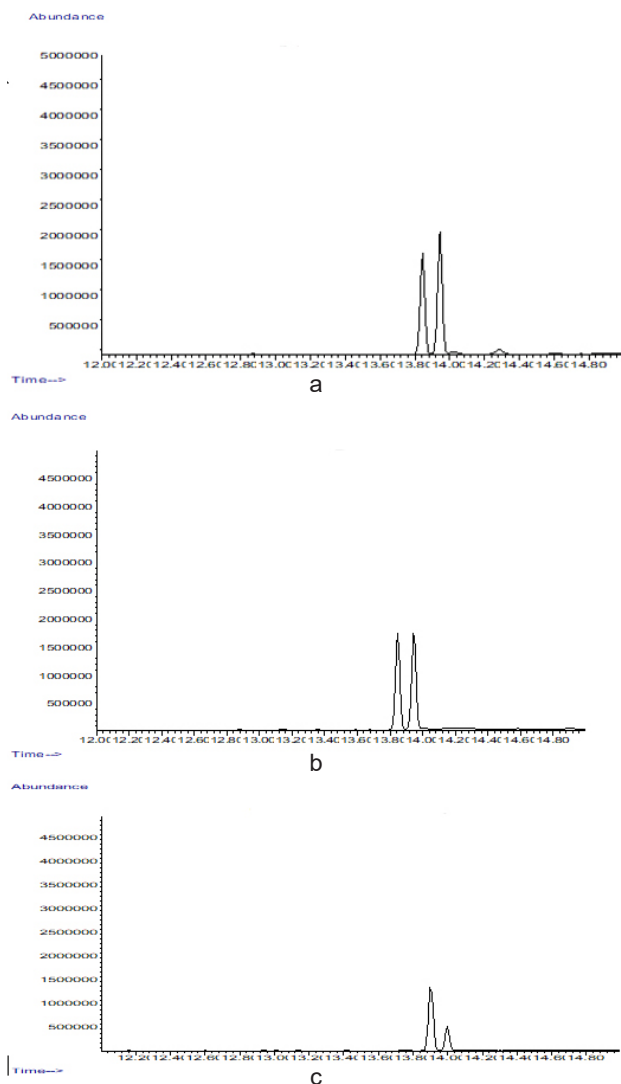
**Таблица 2.** Изменение элементного состава культуральной жидкости после 72 ч ферментации 3-х штаммов молочнокислых бактерий на среде MRS

**Table 2.** Changes in the elemental composition of the culture liquid after 72 h of fermentation of 3 strains of lactic acid bacteria on MRS medium

Элемент	Содержание в исходной среде, мг/л	Содержание в культуральной жидкости после 72 ч культивирования, мг/л		
		<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i>
Азот общий	3495	2675	2550	2580
Натрий	1276,6	1223,1	1233,2	1235,2
Калий	1019,1	922,7	886,6	846,1
Фосфор	345,8	369,1	351,8	324,7
Кальций	200,2	19422,3	16362	8428,4
Сера	118,4	192,7	176,5	178,3
Магний	29,7	153,9	49,8	71,1
Марганец	12,6	17,4	12,6	12,7
Железо	3,9	9,8	3,9	1,2
Цинк	0,68	1,16	1,4	2,83
Бор	0,4	0,17	0,33	0,28
Алюминий	0,4	7,1	0,83	0,57
Индий	0,37	0,55	0,06	0
Мышьяк	0,22	0,45	0,34	0,06
Стронций	0,19	8,55	5,65	5,44
Титан	0,18	0,21	0,59	0
Селен	0,14	0,1	0,04	0
Медь	0,049	0	0,13	0,071
Никель	0,043	0	0	0
Барий	0,031	0,535	0,1	0,162
Кобальт	0,029	0,02	0,04	0,01
Хром	0,023	0,09	0,05	0,01
Ванадий	0,02	0	0,04	0,03
Свинец	0,01	0,09	0,02	0
Висмут	0,01	0	0	0,04
Литий	0,01	0,06	0,04	0,03
Галлий	0,002	0,01	0,03	0,01
Сурьма	0,002	0,061	0,08	0

кислоты с содержанием L-молочной кислоты в пределах 49,35–52,11%. В отличие от них *L. lactis* показал количественное преобладание доли L-молочной кислоты с примесью D-изомера 27%.

Из литературных источников известно, что L-изомер способны продуцировать МКБ родов *Streptococcus*,



Результаты хроматографического анализа ментильных эфиров молочной кислоты, содержащихся в конечной культуральной жидкости *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 (a), *Lactobacillus acidophilus* 5 Ds (b) и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (c)

Results of the chromatographic analysis of menthyl lactates contained in the final culture liquid of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 (a), *Lactobacillus acidophilus* 5 Ds (b) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (c)

*Pediococcus*, *Lactococcus* и *Lactobacillus*. D-изомер могут продуцировать только отдельные штаммы рода *Lactobacillus* [19], смесь 2-х стереоизомеров обычно продуцируется гомоферментативными бактериями. Среди кокковых форм рода *Lactococcus* молочную кислоту в D-конфигурации продуцируют виды *Streptococcus cremoris*, *S. lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis*, виды рода *Pediococcus* образуют МК в DL-конфигурации. Применение реконструктивных технологий позволяет получить виды бактерий, продуцирующие отдельные изомеры L- и D-молочной кислоты. У некоторых микроорганизмов, таких как *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* и дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, отсутствует активность пируватформатлиазы и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), и эти гены могут быть вставлены через генные источники L-/D-LDH из молочнокислых бактерий, крупного рогатого скота и грибов для экспрессии гена D(-)-LDH из молочнокислых бактерий с получением энантимерных изомеров в минимальной среде с оптической чистотой >99,9% [20]. Стоит отметить, что существует необходимость понимания количественного соотношения L- и D-изомеров МК, т.к. включения D-изомеров до 15% могут приводить к получению биоразлагаемых полимеров с полукристаллической структурой, а не рацемата [21].

По результатам данной работы установлено, что штаммы *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 и *L. acidophilus* 5 Ds обладают высокими показателями продуктивности по МК, однако продуцируют ее рацематы, что ограничивает сферы их использования в промышленности. Для получения биоразрушаемого полимера полилактида из исследуемых продуцентов наиболее предпочтителен *Lactococcus lactis*, т.к. он производит смесь молочной кислоты с более высоким содержанием L-изомера, в связи с его более высокой стереочистотой, что является важным показателем при производстве кристаллического полилактида.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам периодического глубинного культивирования штаммов МКБ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 (ВКПМ В-2368), *Lactobacillus acidophilus* 5 Ds (ВКПМ В-2846) и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ВКМ В-1662) наиболее продуктивным из выбранных оказался штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11, который позволяет получать до 1,94 г/(л×ч) молочной кислоты с конечным ее выходом 132,0 г/л за 72 ч культивирования. *Lactobacillus acidophilus* 5 Ds и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* продемонстрировали продуктивность 1,87 и 0,76 г/(л×ч) соответственно. Все исследованные штаммы продуцировали рацематы молочной кислоты.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Solval K.M., Chouljenko A., Chotiko A., Sathivel S. Growth kinetics and lactic acid production of *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *L. acidophilus* NRRL B-4495, and *L. reuteri* B-14171 in media containing egg white hydrolysates // LWT. 2019. Vol. 105. P. 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.058>.
2. Shipovskaya E.A., Eveleva V.V., Cherpалova T.M.

Biosynthetic activity study of *Lactobacillus acidophilus* lactic acid bacteria in the lactose fermentation of whey // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 4. С. 635–642. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-635-642>.

3. Илушка И.В., Доценко С.П. Влияние основных факторов процесса культивирования на кислото-

образующую способность продуцента молочной кислоты *Lactococcus lactis* CH5 // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2012. N 82. С. 48–57.

4. Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Еремец В.И., Шинкарев С.М., Неминущая Л.А., Скотникова Т.А. [и др.]. Тенденции развития производства молочной кислоты // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20. N 1. С. 162–166.

5. Шинкарев С.М., Самуйленко А.Я., Неминущая Л.А., Скотникова Т.А., Павленко И.В., Рубцова Г.Н. [и др.]. Совершенствование микробиологического синтеза молочной кислоты // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20. N 18. С. 165–170.

6. Евелева В.В., Коршунова Н.А., Баракова Н.В. Перспективные сырьевые источники для производства молочной кислоты // Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке: IX Международная научно-техническая конференция (г. Санкт-Петербург, 13–15 ноября 2019 г.). СПб.: Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2019. Т. 2. С. 74–78.

7. Wang J., Wang Q., Xu Z., Zhang W., Xiang, J. Effect of fermentation conditions on L-lactic acid production from soybean straw hydrolysate // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015. Vol. 25, no. 1. P. 26–32. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05025>.

8. Бондарева О.В., Толкачева А.А., Некрасова Н.А., Шуваева Г.П., Черенков Д.А., Корнеева О.С. Подбор оптимальных условий биосинтеза молочной кислоты // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2022. Т. 84. N 1. С. 112–117. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2022-1-112-117>.

9. Саламатзаде А.А., Ганбаров Х.Г., Кафшдарджалал А.М. Влияние условий культивирования на продуцирование молочной кислоты у бактерий рода *Lactobacillus* // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2011. N 2. С. 73–77.

10. Мингазова Л.А., Канарский А.В., Крякунова Е.В., Канарская З.А. Синтез молочной кислоты грибом *Rhizopus oryzae* F-1030 на питательных средах из сульфитных щелоков // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2020. N 2. С. 146–158. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2020-2-146-158>.

11. Kawai Y., Saito T., Konno T., Itoh T. Compositional characteristics of lactic acids produced by *Lactobacil-*

*lus acidophilus* group lactic acid bacteria // Animal Science and Technology. 1996. Vol. 67, no. 7. P. 621–629.

12. Shibata K., Flores D.M., Kobayashi G., Sonomoto K. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium* // Enzyme and Microbial Technology. 2007. Vol. 41, no. 1-2. P. 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.020>.

13. Колеснов А.Ю., Володина Е.М., Альперович Е.Д. Ферментативный анализ изомеров молочной кислоты в молочных продуктах и сырье // Пищевая промышленность. 1997. N 3.

14. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // Journal of Applied Bacteriology. 1960. Vol. 23, no. 1. P. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.

15. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Синецкий С.П. Спектрофотометрическое определение молочной кислоты // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71. N 8. С. 787–790. <https://doi.org/10.7868/S004445021608003X>.

16. Ding X., Lin Sh., Weng H., Liang J. Separation and determination of the enantiomers of lactic acid and 2-hydroxyglutaric acid by chiral derivatization combined with gas chromatography and mass spectrometry // Journal of Separation Science. 2018. Vol. 41, no. 12. P. 2576–2584. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701555>.

17. Бочкова А.П., Евелева В.В. Технология молочной кислоты с использованием селекционированного штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii* ВКПМ в-8744 // Успехи современного естествознания. 2005. N 9. С. 68–68.

18. Шавыркина Н.А., Скиба Е.А. Получение молочной кислоты из шелухи овса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 99–106. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-106>.

19. Carr F.J., Chill D., Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey // Critical Reviews in Microbiology. 2002. Vol. 28, no. 4. P. 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>.

20. Abedi E., Hashemi S.M.B. Lactic acid production-producing microorganisms and substrates sources-state of art // Heliyon. 2020. Vol. 6, no. 10. P. e04974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>.

21. Annunziata M., Natri L., Cecoro G., Guida L. The use of Poly-D, L-lactic acid (PDLLA) devices for bone augmentation techniques: a systematic review // Molecules. 2017. Vol. 22, no. 12. P. 2214. <https://doi.org/10.3390/molecules22122214>.

## REFERENCES

1. Solval K.M., Chouljenko A., Chotiko A., Sathivel S. Growth kinetics and lactic acid production of *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *L. acidophilus* NRRL B-4495, and *L. reuteri* B-14171 in media containing egg white hydrolysates. LWT. 2019;105:393–399. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.058>.

2. Shipovskaya E.A., Eveleva V.V., Cherpilova T.M. Biosynthetic activity study of *Lactobacillus acidophilus* lactic acid bacteria in the lactose fermentation of whey. Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry

and Biotechnology. 2019;9(4):635–642. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-635-642>.

3. Ilushka I.V., Dotsenko S.P. The influence of glucose and yeast autolysate concentration and the method of cultivation on productivity of lactic acid producer *Lactococcus lactis* CH5. Politematicheskii setevoi elektronnyi nauchnyi zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University. 2012;(82):48–57. (In Russian).

4. Samuilenko A.Ya., Grin' S.A., Eremets V.I.,



Shinkarev S.M., Neminushchaya L.A., Skotnikova T.A., et al. Lactic acid production development trends. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta = Herald of Technological University*. 2017;20(1):162-166. (In Russian).

5. Shinkarev S.M., Samuilenko A.Ya., Neminushchaya L.A., Skotnikova T.A., Pavlenko I.V., Rubtsova G.N., et al. Improving the microbiological synthesis of lactic acid. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta = Herald of Technological University*. 2017;20(18):165-170. (In Russian).

6. Eveleva V.V., Korshunova N.A., Barakova N.V. Promising raw materials for the production of lactic acid. In: *Nizkotemperaturnye i pishchevye tekhnologii v XXI veke: IX Mezhdunarodnaya nauchno-tekhnicheskaya konferentsiya = Low temperature and food technologies in the 21st century: IX International Scientific and Technical Conference*. 13-15 November 2019, Saint Petersburg. Saint Petersburg; 2019, vol. 2, p. 74-78. (In Russian).

7. Wang J., Wang Q., Xu Z., Zhang W., Xiang, J. Effect of fermentation conditions on L-lactic acid production from soybean straw hydrolysate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015;25(1):26-32. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05025>.

8. Bondareva O.V., Tolkacheva A.A., Nekrasova N.A., Shuvaeva G.P., Cherenkov D.A., Korneeva O.S. Selection of optimal conditions for the lactic acid biosynthesis. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2022;84(1):112-117. (In Russian). <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2022-1-112-117>.

9. Salamatzadekh A.A., Ganbarov Kh.G., Kafshardzhalal A.M. Influence of culture conditions on the production of lactic acid in bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki = Bulletin of the MSRU. Series: Natural Sciences*. 2011;(2):73-77. (In Russian).

10. Mingazova L.A., Kanarsky A.V., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A. Lactic acid synthesis by fungus *Rhizopus oryzae* F-1030 on growth media based on sulphite liquors. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Lesnoi zhurnal = Bulletin of Higher Educational Institutions. Russian Forestry Journal*. 2020;(2):146-158. (In Russian). <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2020-2-146-158>.

11. Kawai Y., Saito T., Konno T., Itoh T. Compositional characteristics of lactic acids produced by *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *Animal Science and Technology*. 1996;67(7):621-629.

12. Shibata K., Flores D.M., Kobayashi G., Sonomoto K. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;41(1-2):149-155. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.020>.

13. Kolesnov A.Yu., Volodina E.M., Al'perovich E.D. Enzymatic analysis of lactic acid isomers in dairy products and raw materials. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 1997;(3). (In Russian).

14. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 1960;23(1):130-135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.

15. Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sineokii S.P. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Zhurnal analiticheskoi khimii = Journal of Analytical Chemistry*. 2016;71(8):787-790. (In Russian). <https://doi.org/10.7868/S004445021608003X>.

16. Ding X., Lin Sh., Weng H., Liang J. Separation and determination of the enantiomers of lactic acid and 2-hydroxyglutaric acid by chiral derivatization combined with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2018;41(12):2576-2584. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701555>.

17. Bochkova A.P., Eveleva V.V. Lactic acid technology using a selected strain of lactic acid bacteria *Lactobacillus delbrueckii* VKPM v-8744. *Uspekhi sovremenno estestvoznaniya*. 2005;(9):68-68. (In Russian).

18. Shavyrkina N.A., Skiba E.A. Obtaining lactic acid from oat husks. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):99-106. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-106>.

19. Carr F.J., Chill D., Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 2002;28(4):281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>.

20. Abedi E., Hashemi S.M.B. Lactic acid production-producing microorganisms and substrates source-state of art. *Heliyon*. 2020;6(10):e04974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>.

21. Annunziata M., Nastro L., Cecoro G., Guida L. The use of Poly-D, L-lactic acid (PDLLA) devices for bone augmentation techniques: a systematic review. *Molecules*. 2017;22(12):2214. <https://doi.org/10.3390/molecules22122214>.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Суханова Анна Алексеевна,  
к.б.н., старший научный сотрудник,  
начальник ОБПМ РЦ «КАС»,  
Сибирский государственный университет науки  
и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
660037, г. Красноярск, пр-т им. газеты  
Красноярский рабочий, 31,  
Российская Федерация,  
shumilova.ann@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-5830-1450>

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna A. Sukhanova,  
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,  
Head of DBPM RC "SAS",  
Reshetnev Siberian State University  
of Science and Technology,  
31, Gazeta Krasnoyarski Rabochii Ave.,  
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,  
shumilova.ann@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-5830-1450>



**Ертилецкая Наталья Леонидовна**,  
младший научный сотрудник ОБПМ РЦ «КАС»,  
Сибирский государственный университет науки  
и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
660037, г. Красноярск, пр-т им. газеты  
Красноярский рабочий, 31,  
Российская Федерация,  
✉natalya.ertiletskaya@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0003-2626-893X>

**Бояндин Анатолий Николаевич**,  
к.б.н., старший научный сотрудник  
ОБПМ РЦ «КАС»,  
Сибирский государственный университет науки  
и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
660037, г. Красноярск, пр-т им. газеты  
Красноярский рабочий, 31,  
Российская Федерация,  
boyandin@biopolymer.pro  
<https://orcid.org/0000-0002-9190-2792>

**Сырцов Сергей Николаевич**,  
научный сотрудник ОБПМ РЦ «КАС»,  
Сибирский государственный университет науки  
и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
660037, г. Красноярск, пр-т им. газеты  
Красноярский рабочий, 31,  
Российская Федерация,  
kaideil@list.ru  
<https://orcid.org/0009-0001-6308-0031>

**Середа Анна Алексеевна**,  
лаборант-исследователь ОБПМ РЦ «КАС»,  
Сибирский государственный университет науки  
и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
660037, г. Красноярск, пр-т им. газеты  
Красноярский рабочий, 31,  
Российская Федерация,  
nensi.sereda@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0007-1891-4846>

**Прокопчук Юлия Александровна**,  
лаборант-исследователь ОБПМ РЦ «КАС»,  
Сибирский государственный университет науки  
и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
660037, г. Красноярск, пр-т им. газеты  
Красноярский рабочий, 31,  
Российская Федерация,  
batori\_bloody@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0005-4653-0319>

**Бротт Валерия Викторовна**,  
лаборант-исследователь ОБПМ РЦ «КАС»,  
Сибирский государственный университет науки  
и технологий им. М.Ф. Решетнева,  
660037, г. Красноярск, пр-т им. газеты  
Красноярский рабочий, 31,  
Российская Федерация,  
valerie\_brt@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0009-5819-119X>

#### **Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад  
в подготовку публикации.

**Natalya L. Ertiletskaya**,  
Junior Researcher,  
DBPM RC "SAS",  
Reshetnev Siberian State University  
of Science and Technology,  
31, Gazeta Krasnoyarski Rabochii Ave.,  
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,  
✉natalya.ertiletskaya@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0003-2626-893X>

**Anatoly N. Boyandin**,  
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,  
DBPM RC "SAS",  
Reshetnev Siberian State University  
of Science and Technology,  
31, Gazeta Krasnoyarski Rabochii Ave.,  
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,  
boyandin@biopolymer.pro  
<https://orcid.org/0000-0002-9190-2792>

**Sergey N. Syrtsov**,  
Researcher,  
DBPM RC "SAS",  
Reshetnev Siberian State University  
of Science and Technology,  
31, Gazeta Krasnoyarski Rabochii Ave.,  
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,  
kaideil@list.ru  
<https://orcid.org/0009-0001-6308-0031>

**Anna A. Sereda**,  
Lab-assistant,  
DBPM RC "SAS",  
Reshetnev Siberian State University  
of Science and Technology,  
31, Gazeta Krasnoyarski Rabochii Ave.,  
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,  
nensi.sereda@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0007-1891-4846>

**Yulia A. Prokopchuk**,  
Lab-assistant,  
DBPM RC "SAS",  
Reshetnev Siberian State University  
of Science and Technology,  
31, Gazeta Krasnoyarski Rabochii Ave.,  
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,  
batori\_bloody@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0005-4653-0319>

**Valeria V. Brott**,  
Lab-assistant,  
DBPM RC "SAS",  
Reshetnev Siberian State University  
of Science and Technology,  
31, Gazeta Krasnoyarski Rabochii Ave.,  
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,  
valerie\_brt@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0009-5819-119X>

#### **Contribution of the authors**

The authors contributed equally to this article.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

**Информация о статье**

Поступила в редакцию 05.04.2023.

Одобрена после рецензирования 26.04.2023.

Принята к публикации 30.05.2023.

**Conflict interests**

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

**Information about the article**

The article was submitted 05.04.2023.

Approved after reviewing 26.04.2023.

Accepted for publication 30.05.2023.