УДК 576.8:573.6.086.83

STORE OF CULTURES OF LACTIC ACID MICROORGANISMS

S. Danylenko
Institute of Food Resourses of National Academy of Agrarian Sciences

Key words:
Storage
Protective environment
Lyophilization
Microorganisms

Article history:
Received 04.10.2014
Received in revised form 20.10.2014
Accepted 02.11.2014

Corresponding author:
S. Danylenko
E-mail:
svet1973@gmail.com

ABSTRACT

The influence of protective environments of various compositions on the conservation of lactic acid microorganisms of various types upon lyophilization and long-term storage has been investigated in the article. The necessity of selecting a protective environment for each culture and not only for the genus of microorganism has been shown.

ЗБЕРІГАННЯ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

С.Г. Даниленко
Інститут продовольчих ресурсів Національної академії аграрних наук

У статті досліджено вплив різних за складом захисних середовищ на збереження молочнокислих мікроорганізмів різних видів за ліофілізації й тривалого зберігання. Показано необхідність підбору захисного середовища для кожного виду, а не лише для роду мікроорганізму.

Ключові слова: *зберігання, захисні середовища, ліофілізація, мікроорганізми.*

Для тривалого зберігання музейних культур мікроорганізмів застосовують різноманітні методи консервування біомаси, але ефективне консервування з повним збереженням популяцій є проблемним, особливо якщо враховувати різноманітність мікроорганізмів, а також те, що здатність зберігати активність культури за певних умов пов'язана не тільки з родом і видом мікроорганізму, але й з його підвидом. Зважаючи на це, актуальним залишається пошук кріопротекторів і методів консервування для окремо взятих мікроорганізмів.

На сьогодні існують такі методи зберігання мікроорганізмів:

- методи нетривалого зберігання мікроорганізмів, які використовуються для повсякденної роботи з мікроорганізмами (субкультивування або метод перевивання культур);

- методи тривалого зберігання мікроорганізмів. Тривале зберігання мікроорганізмів без втрати технологічно цінних властивостей проводять методами, які забезпечують істотне гальмування життєздатності мікроорганізму.

Зберігання досягається шляхом глибокого заморожування мікроорганізмів або їх висушування із замороженого (ліофілізація) або безпосередньо з рідкого стану (висушування). Високий ефект консервації такими методами досягається за рахунок того, що клітини, позбавляючись вільної води в умовах кріогенних температур, переходять у стан анабіозу.

Підтримка штамів в активному стані, збереження їхніх цінних біологічних властивостей є важливими умовами роботи з мікроорганізмами — від первинного вивчення до використання їх у виробництві різних біопрепаратів [1, 2]. Щоб знизити вплив різних факторів при заморожуванні мікроорганізмів, необхідно підбирати захисні речовини або кріопротектори [3, 4].

Через велике розмаїття мікроорганізмів одним кріопротектором у практичній роботі не обходяться, тому при кріоконсервуванні штамів слід попередньо перевірити дію на них різних за складом кріопротекторів і вибрати найкращий за функціональністю.

Найефективнішими є комбіновані захисні середовища (ЗС), до складу яких входять дисахариди (цукроза, трегалоза, лактоза, мальтоза), полісахариди, цитрат або глутамат натрію, тіосечовина, також доцільно додавати знежирене або гідролізоване молоко, молочну сироватку, сусло, пептон та інші природні компоненти [5].

Мета дослідження. Підбір захисного середовища для ліофілізації різних видів молочнокислих мікроорганізмів (МКБ).

Об'єкти і методи дослідження. Об'єктами досліджень були культури мікроорганізмів *Lactobacillus rhamnosus, L. plantarum* та *L. paracasei ssp. paracasei* з колекції промислових штамів відділу біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН.

У роботі використовували традиційні мікробіологічні методи дослідження. Кількість МКБ визначали за ГОСТ 10444.11-89 [6]. Було досліджено вісім варіантів ЗС за впливом на життєздатність молочнокислих бактерій упродовж ліофілізації. До складу ЗС залучали сполуки, які підвищували стійкість мікроорганізмів до заморожування та сушіння: білкові (сухе знежирене молоко, желатин та агар) та вуглеводні компоненти (сахароза, інозит, маніт, гліцерин), а також солі (табл. 1). Контроль — дистильована вода.

Таблиця 1. **Варіанти захисних середовищ**

Склад захисних середовищ								
Варіанти / Компоненти	1	2	3	4	5	6	7	8
	Вміст у захисному середовищі, г							
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сухе знежирене молоко	10,0	3,0	3,0	5,0	-	-	14	14
Інозит	-	-	-	-	-	-	-	10
Цитрат натрію	0,2	-	-	5,0	2,0	5,0	-	-
Сахароза	1,0	-	15,0	15,0	10,0	25,0	10	-
$MgSO_4$	0,05	-	-	-	-	-	-	-
Гліцерин	-	-	-	-	2,0	-	-	-

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Фосфатний буфер, pH 6,86	-	10,0	-	-	-	-	-	-
Агар	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1
Маніт	-	7,0	-	-	-	-	-	-
Желатин	-	-	5,0	-	-	3,5	1,0	-
Вода	До 100 $см^3$							

Культури МКБ нарощували на середовищі МРС упродовж 14 год за температури (32±2) °С, змішували з різними варіантами ЗС у співвідношенні 1:2. Сушіння здійснювали на сублімаційній сушарці ТГ15 за таких режимів: початкова температура мінус (40±1) °С, кінцева — плюс (30 ± 2) °С, залишковий тиск не більше 6,65 Па (0,679 кгс/$м^2$). Тривалість сушіння — 30—34 год. Ступінь виживання бактерій визначали за їх вмістом до і після ліофілізації. Дані з виживання культур за сублімаційного висушування представлені в табл. 2.

Результати і обговорення. Молочнокислі бактерії були чутливими до заморожування та сублімаційного сушіння і втрачали від 2,1 % до 15,2 % життєздатних клітин.

Таблиця 2. **Вплив захисних середовищ на ступінь виживання культур**

Варіанти ЗС*	Ступінь виживання, %		
	L. rhamnosus	*L. plantarum*	*L. paracasei ssp. paracasei*
ЗС 1	84,8	98,5	97,4
ЗС 2	88,4	90,2	81,2
ЗС 3	97,9	97,5	95,5
ЗС 4	98,3	93,9	91,9
ЗС 5	90,0	92,4	91,4
ЗС 6	95,2	98,0	96,3
ЗС 7	99,7	83,4	98,8
ЗС 8	95,4	99,5	89,4
К	76,0	77,0	75,0

Примітка. *Нумерація варіантів збігається з нумерацією захисного середовища. Наведено середні значення, n=4, P≤0,05, К — культура з дистильованою водою.

Після ліофілізації культура *L. rhamnosus* втрачала до 24 % життєздатних клітин без ЗС, тоді як у варіантах 1—8 втрати були значно меншими і становили (0,3—15,2) %. Ступінь виживання культури була найвищою із ЗС 3, 4, 6, 7 та 8. Застосування ЗС для культури *L. plantarum* (за винятком варіанта 7) сприяло зменшенню втрат на (0,5—9,8) %. Для культури *L. paracasei ssp. paracasei* характерне зменшення втрати клітин від 1,7 % до 10,6 % (табл. 2).

Із літературних джерел відомо, що найсприятливішими для зберігання культур та їх композицій є низькі температури, що забезпечують стабільніший стан мікрофлори, яка перебуває в анабіозі [7, 8].

Важливим фактором, що визначає ступінь виживання бактерій за зберігання, є дотримання температурного режиму та контроль вмісту вологи. Було визначено здатність до зберігання ліофілізованих культур за двох температурних режимів: плюс (4±2) °С і мінус (18±2) °С за відносної вологості повітря 80 %. Результати досліджень представлено на рис 1.

Рівняння швидкості відмирання клітин у процесі зберігання має такий вигляд:

$$\lg N = \lg N_0 - k \cdot \tau, \quad (1)$$

де N, N_0 — кількість клітин мікроорганізмів у момент τ і на початку зберігання, lg КУО в 1 г культури; τ — тривалість зберігання, міс.; k — коефіцієнт, який характеризує швидкість відмирання, lg КУО в 1 г/міс.

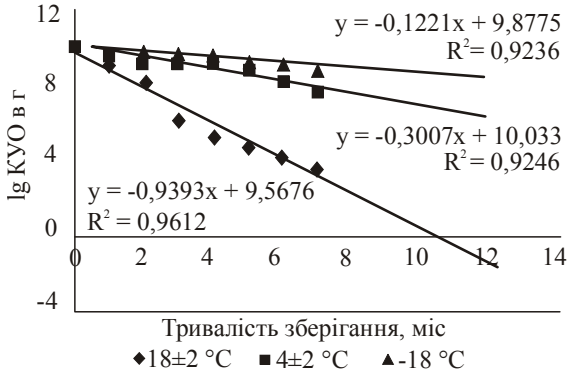

Рис. 1. Вплив захисного середовища № 8 на збереженість *L. Plantarum* за різних температур

Завдяки використанню закономірностей були отримані рівняння лінійної залежності швидкості відмирання клітин МКБ у процесі зберігання за різних температур. Встановлено, що виживання МКБ залежить від температури зберігання. За температури плюс (4±2) ºС упродовж перших шести місяців зберігання всі культури втрачали 8–30 % життєздатних клітин бактерій від початкового вмісту, які відмирали зі швидкістю 0,18—0,54 год$^{-1}$. У наступні три місяці темп відмирання прискорився $\mu_{відм}$=0,35—0,74 год$^{-1}$.

Найбільший ступінь виживання спостерігали за температури мінус (18±2) °С для всіх МКБ. Після 12 місяців зберігання частка втрачених клітин молочнокислих бактерій складала (5—10) %, від початкового вмісту (див. рис.1). Подовження терміну зберігання ще на три місяці викликало подальше відмирання зі швидкістю 0,52—1,1 год$^{-1}$, що призводило до втрати 8—20 % клітин від початкової концентрації.

Максимальне виживання культури *L. rhamnosus* після 12 місяців зберігання, за температури мінус (18±2) °С, спостерігали при використанні ЗС № 7, яке становило 99,7 %. Слід зазначити, що культура *L. plantarum* після 12 місяців зберігання мала більшу кількість життєздатних клітин, ніж культура *L. rhamnosus.* ЗС № 8, яке складається з 14 % знежиреного молока з добавкою 10 % інозиту та 0,1 % агару забезпечувало максимальну збереженість культури *L. paracasei ssp. paracasei* (98,8 %), після 12 місяців зберігання. Також помічено високе виживання цієї культури і при сублімаційному висушуванні з іншими ЗС (81,2—97,4 %).

Висновки

Отримані результати свідчать про необхідність застосування захисного середовища для ліофілізації лактобактерій. Доведено, що застосування захисних

середовищ збільшувало кількість життєздатних молочнокислих мікроорганізмів не тільки за ліофілізації, а й за подальшого їхнього зберігання Так, після шести місяців зберігання за температури плюс (4±2) ºС кількість клітин *L. rhamnosus*, ліофілізованої із застосуванням захисних середовищ, збереглася на 11,6—31,2 %, *L. plantarum* — 17—29 % та *L. paracasei ssp. paracasei* — 8,3—31,7 % краще, ніж вказані штами, ліофілізовані з дистильованою водою. Зберігання культур за температури мінус (18±2) °С подовжує термін зберігання всіх МКБ до 12 місяців. Встановлено, що культура *L. rhamnosus* більш чутлива до сублімаційного сушіння порівняно з культурами *L. plantarum* та *L. paracasei ssp. paracasei*. Захисне середовище слід підбирати не тільки для роду, а й для окремого виду мікроорганізму.

Література

1. *Методы* общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда. — М.: Мир, 1983. — Т. 1. — 536 с.

2. *Сидякина Т.М.* Консервация микроорганизмов / Т.М Сидякина. — Пущино: ОНТИ НЦБИ, 1985. — 63 с.

3. *Malik K.A.* Liquid-drying of microorganisms using a simple apparatus // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 1992. — V. 8. — P. 80—82.

4. *Белоус А.М.* Криоконсерванты / А.М. Белоус, М.И. Шраго, Н.С. Пушкарь. — К.: Наукова думка, 1979. — 198 с.

5. *Брусиловский Л.П.* Управление процессами культивирования микроорганизмов, заквасок и кисломолочных продуктов / Л.П. Брусиловский, Л.А. Банникова, И.А Вайнберг. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. — 128 с.

6. *Продукты* пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов: ГОСТ 10444.11 — 89. — [Дата введения 1991-01-01]. — М.: Издательство стандартов, 1990. — С. 15 (Межгосударственный стандарт).

7. *Сотченко О.Г.* Изучение некоторых аспектов технологии получения бактериальных концентратов / О.Г. Сотченко // Весці НАНБ, Серыя аграрных навук. — 2006. — № 5. — С. 230—232.

8. *Тихонов И.В.*. Биотехнология / Учебник / [И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева и др]; под ред. Е.С. Воронина — СПб.: ГИОРД, 2008. — 704 с.

СОХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

С.Г. Даниленко
Институт продовольственных ресурсов

В статье исследовано влияние различных по составу защитных сред на сохранение молочнокислых микроорганизмов различных видов при лиофилизации и продолжительном хранении. Показана необходимость подбора защитной среды для каждого вида, а не для рода микроорганизма.

Ключевые слова: *защитные среды, лиофилизация, микроорганизмы, хранение.*