

О.С. Прищепова, Н.С. Кравченко, С.Б. Борунова, С.Л. Василенко,
Н.Н. Фурик

РУП «Институт мясо-молочной промышленности»

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЛАКТОБАЦИЛЛ РАЗНЫХ ВИДОВ К ЗАМОРАЖИВАНИЮ

Определена устойчивость 9 штаммов лактобацилл к замораживанию при двух режимах консервации: сверхбыстром замораживании в среде жидкого азота или медленном, в морозильной камере, для чего использовали бактериальные культуры, выращенные на питательных средах MRS и BOM-10. Показано, что по чувствительности к действию низких температур лактобациллы можно условно разделить на три группы – культуры с низкой чувствительностью к замораживанию (выживаемость клеток составила 98 % и выше), бактерии со средней чувствительностью к замораживанию (выживаемость – 80–95 %), лактобациллы с высокой чувствительностью к замораживанию (выживаемость – ниже 80 %).

Введение

В последние годы отмечается интенсивное развитие производства пробиотических продуктов питания, что обусловлено действием негативных внешних и внутренних факторов (бесконтрольное применение антибиотиков, стрессы, неправильное питание, пищевые отравления, кишечные инфекции, малоподвижный образ жизни и многое другое) [5].

Пробиотические продукты производятся с применением микроорганизмов, являющихся представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Известно, что лактобациллам принадлежит важная роль в поддержании нормального пищеварения, поскольку в желудочно-кишечном тракте они ферментируют лактозу до молочной кислоты, оказывающей антисептическое действие и трансформирующей кальций, поступающий с пищей, в усвояемый лактат кальция [5]. Так, бактерии рода *Lactobacillus* обладают иммуностимулирующим действием за счет наличия в их клеточной стенке пептидогликанов и тейхоевых кислот, известных поликлональных индукторов иммуномодуляторов [5–9]. Бактерии *L. acidophilus* обладают выраженной противоопухолевой активностью в отношении злокачественных новообразований в кишечнике, а также выраженным вирусоцидным действием благодаря продукции высокоактивной перекиси водорода [5, 8]. Бактерии *L. casei* обладают высокой противоопухолевой активностью в отношении сарком [5–9]. Для бактерий *L. plantarum* показана способность в анаэробных условиях образовывать уксусную и

молочную кислоту, а также катаболизировать аргинин и генерировать окись азота, которая участвует в таких функциях кишечника, как бактериостаз, секреция мускуса, перистальтика, обеспечение местного иммунитета [5, 7]. Использование лактобацилл в питании вызывает существенное улучшение деятельности организма, способствует его выздоровлению и, таким образом, в некоторых случаях помогает избежать применения лекарственных средств.

Неотъемлемым элементом биотехнологии ферментированных молочных продуктов являются бактериальные закваски и концентраты, представляющие собой специально подобранные и подготовленные чистые культуры или комбинации молочнокислых бактерий. Наиболее перспективным способом применения бактериальных концентратов для производства кисломолочных продуктов является их непосредственное внесение в подготовленное сырье, что обеспечивается высоким содержанием жизнеспособных микроорганизмов. Применение бактериальных концентратов прямого внесения позволяет повысить санитарную культуру и безопасность производства, получить продукт с улучшенными санитарно-гигиеническими и органолептическими характеристиками, то есть повысить качество изготавливаемой продукции.

В настоящее время во всем мире активно проводятся исследования, направленные на разработку технологии производства криозамороженных бактериальных концентратов прямого внесения [4]. Преимущества данного метода консервации состоят в его простоте и удобстве, минимуме подготовительной работы, быстром извлечении хранимого материала для восстановления после замораживания. При использовании этого метода консервации довольно редки генетические изменения, а культуры микроорганизмов, сохраняемые таким методом, оказываются менее поврежденными и имеют более высокий уровень жизнеспособности, чем при высушивании и лиофилизации [4–3].

Целью данного исследования явилось изучение устойчивости бактериальных культур лактобацилл, относящихся к разным видам, к замораживанию.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись девять штаммов лактобацилл разных видов: *L. plantarum* 2645 ML-O, *L. casei* 1196 ML-OFR, *L. rhamnosus* 2637 TL-O, *L. helveticus* 2389 LA-AV, *L. acidophilus* 2649 TL-O, *L. gasseri* 2638 TL-O, *L. delbrueckii subsp. lactis* 2636 TL-A, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 1525 TL-A и *L. fermentum* 2652 TL-O из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий.

Культивирование микроорганизмов осуществляли в MRS-среде [6], содержащей 0,15 % агара и среде BOM-10 [1]. Инкубировали в термостате при 34 ± 1 °C (*L. plantarum*, *L. casei*), 37 ± 1 °C (*L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. fermentum*) и 42 ± 2 °C (*L. delbrueckii* ssp.).

Получение 16±2 часовых бактериальных культур на среде BOM-10. Для культур – сильных кислотообразователей (*L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*) заквашивание стерильного восстановленного молока производили из расчета 1 петля на 10 мл молока; для остальных культур – слабых кислотообразователей (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. fermentum*) – из расчета 0,5 мл выращенной на среде MRS культуры вносили в 10 мл стерильного восстановленного молока. Инкубировали в термостате при оптимальной температуре в течение 16±2 ч.

Для получения 16±2 ч бактериальных культур на среде MRS 0,1 мл бактериальной суспензии вносили в 15 мл агаризованной среды. Инкубировали в термостате при оптимальной температуре в течение 16±2 ч.

Замораживание бактерий при сверхнизких температурах осуществляли следующим образом. 16±2 ч. культуры лактобацилл в среде культивирования (MRS или BOM-10) тщательно перемешивали и разливали по 1,2 мл в полипропиленовые пробирки без использования криопротекторов. Пробирки с культурой помещали в жидкий азот, выдерживали в нем в течении 1 мин, после чего хранили в морозильной камере при температуре – 25±2 °С в течение 24±2 ч.

Замороженные бактериальные культуры размораживали на водяной бане при 37±1 °С в течении 2 мин и из соответствующих разведений делали высевы для определения количества жизнеспособных клеток.

Замораживание бактерий в морозильной камере осуществляли следующим образом. 16±2 ч культуры лактобацилл в среде культивирования (MRS или BOM-10) тщательно перемешивали и разливали по 1,2 мл в полипропиленовые пробирки без использования криопротекторов. Пробирки с культурой помещали в морозильную камеру при температуре минус 35±5 °С, выдерживали в ней в течение 60 мин, после чего хранили в морозильной камере при температуре минус 25±2 °С в течение 24±2 ч.

Замороженные бактериальные культуры размораживали на водяной бане при 37±2 °С в течение 2 мин и из соответствующих разведений делали высевы для определения количества жизнеспособных клеток.

Выживаемость (В) молочнокислых микроорганизмов определяли по отношению количества сохранившихся жизнеспособных клеток в 1 мл замороженного образца к первоначальному их количеству в 1 мл образца до замораживания, принятому за 100 %:

$$B = \frac{\lg(KOE_{до})}{\lg(KOE_{после})} * 100, \text{ где:}$$

$\lg(KOE_{до})$ – десятичный логарифм количества жизнеспособных клеток микроорганизмов в 1 мл культуры перед замораживанием;

$\lg(KOE_{после})$ – десятичный логарифм количества жизнеспособных

клеток микроорганизмов в 1 мл культуры после замораживания. Контролем служила бактериальная масса, замороженная без криопротектора или защитной среды.

Результаты и их обсуждение

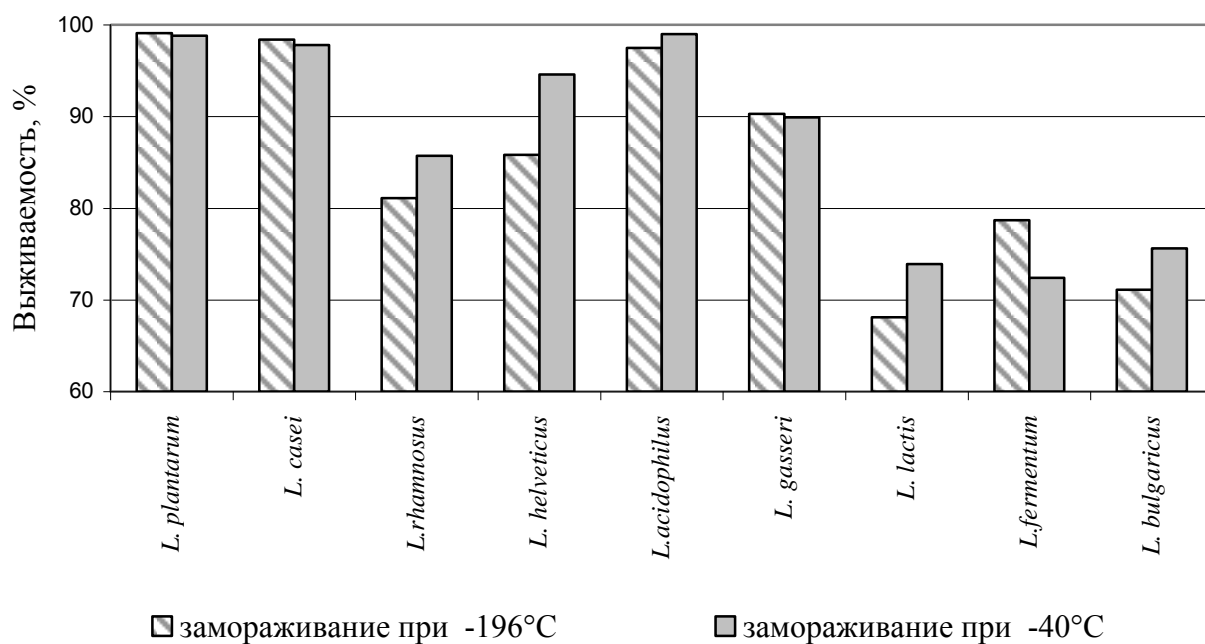
Замораживание бактериальных культур является щадящим способом консервирования микроорганизмов и позволяет сохранять жизнеспособными бактериальные клетки при хранении в течение длительного времени. На сегодняшний день отсутствуют универсальные способы криоконсервации микроорганизмов, поскольку для каждого вида необходимо подбирать как индивидуальные условия замораживания, так и индивидуальный состав защитных сред.

Для проведения исследования использовали по 1 штамму лактобацилл, относящихся к разным видам. В ходе выполнения работы определяли чувствительность микроорганизмов к действию низких температур ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для исследования использовали 16 ± 2 ч культуры бактерий, которые замораживали без добавления криопротекторов в средах культивирования – MRS или BOM-10 (рис. 1, 2).

Как видно из рис. 1, при замораживании культур в питательной среде MRS количество жизнеспособных клеток падает у всех видов лактобацилл. При этом разные виды лактобацилл по-разному реагируют не только на сам процесс замораживания, но и на его способ (сверхбыстрое в среде жидкого азота или медленное в морозильной камере).

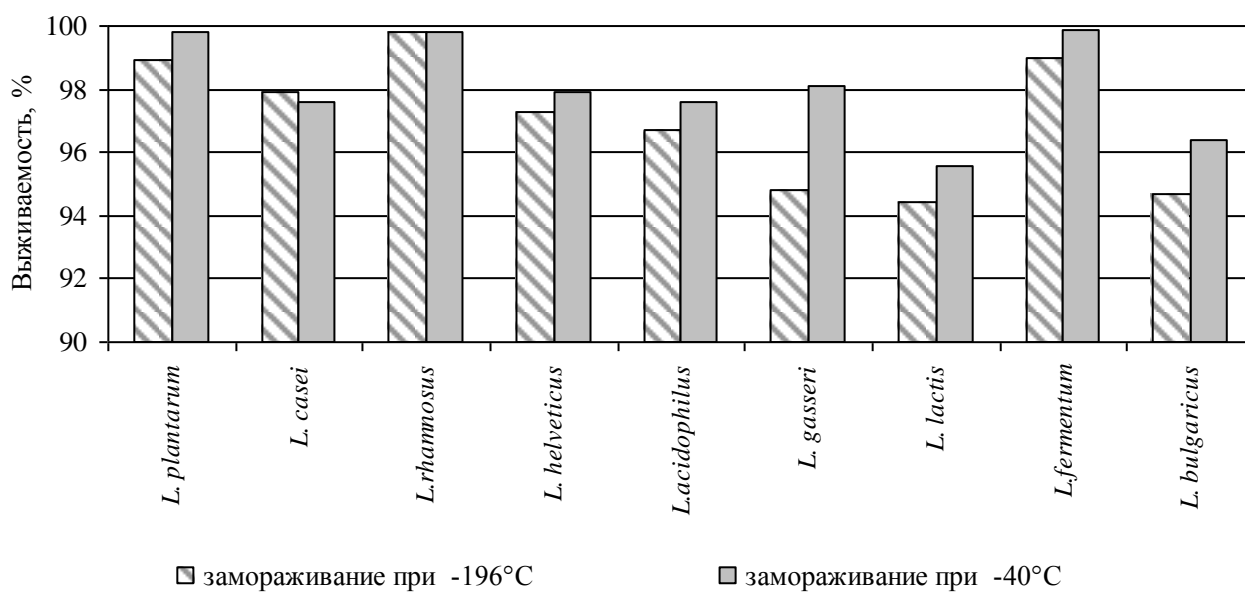
Самыми устойчивыми к замораживанию оказались бактерии *L. plantarum*, *L. casei* и *L. acidophilus*, выживаемость клеток которых составила 98 % и выше. Среднюю устойчивость к замораживанию регистрировали у видов *L. rhamnosus*, *L. gasseri* и *L. helveticus*, выживаемость которых составила 80–95 % при обоих способах замораживания. Чувствительными к замораживанию оказались культуры *L. fermentum*, *L. lactis* и *L. bulgaricus*, выживаемость которых упала до 68–75 % (см. рис. 1).

Таким образом, замораживание клеток лактобацилл в питательной среде MRS без введения в ее состав криопротекторов как в среде жидкого азота так и при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ведет к падению выживаемости, причем не выявлено корреляции падения титра жизнеспособных клеток в зависимости от способа замораживания. Так, при замораживании при температуре $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ бактерии *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. lactis* и *L. bulgaricus* сохраняются лучше, чем при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, в то время как выживаемость клеток *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. casei* и *L. fermentum* выше при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Количество клеток в среде культивирования до замораживания – 100 %

Рис. 1. Выживаемость лактобацилл в питательной среде MRS после замораживания



Количество клеток в среде культивирования до замораживания – 100%

Рис. 2. Выживаемость лактобацилл в питательной среде BOM-10 после замораживания

Как видно на рис. 2, выживаемость клеток лактобацилл, выращенных и замороженных в среде BOM-10, оказалась выше, чем выживаемость культур, замороженных в питательной среде MRS.

Так, для бактерий *L. plantarum*, *L. rhamnosus* и *L. fermentum* регистрировали самую высокую выживаемость при исследуемых температурах замораживания, которая составила выше 98 % для указанных культур.

Самыми чувствительными к действию низких температур оказались культуры *L. lactis*, *L. gasseri* и *L. bulgaricus* (выживаемость в среднем 94–96 %). Для культур лактобацилл *L. casei*, *L. helveticus* и *L. acidophilus* была отмечена средняя выживаемость клеток, которая составила 97 %.

Вывод

Существенного влияния разных способов замораживания на выживаемость клеток лактобацилл, замороженных в среде BOM-10, выявлено не было. Для семи культур лактобацилл выживаемость клеток при медленном замораживании в морозильной камере в среде BOM-10 была выше. Поскольку среда, содержащая молоко, является хорошим криопротектором, использование BOM-10 для замораживания бактерий позволяет увеличить выживаемость практически всех видов лактобацилл по сравнению со средой MRS.

Исследуемые виды лактобацилл можно условно разбить на три группы по чувствительности к действию низких температур:

1 – лактобациллы с низкой чувствительностью (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*);

2 – лактобациллы со средней чувствительностью (*L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. gasseri*);

3 – лактобациллы с высокой чувствительностью (*L. fermentum*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*).

В ходе проведенных исследований установлено значительное падение выживаемости лактобацилл при замораживании в MRS-среде без добавления защитных компонентов, при этом замораживание в среде BOM-10 позволяет значительно повысить выживаемость исследуемых бактерий. Однако количество выживших клеток остается достаточно низким. Повысить выживаемость клеток можно с помощью введения защитных веществ, призванных минимизировать повреждения клеток при замораживании.

Литература

1. Акбулатова, М.М. Солеустойчивость лактобацилл – основа использования штаммов в бактериальных концентратах для производства сыров / М.М. Акбулатова, С.Л. Василенко, Н.Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. редкол.: А.В. Мелещеня [и др.]. – Минск, РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 2011. – Вып. 5. – С. 108–119.

2. Бондаренко, В.М. Пробиотики и механизмы их лечебного

действия / В.М. Бондаренко [и др.] // Экспериментальная клиника гастроэнтерологии – 2004. – № 3. – С. 83–87.

3. Рахуба, Д.В. Криоконсервация пробиотических микроорганизмов: научные основы практического использования / Д.В. Рахуба, Г.И. Новик // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. научн. тр. – 2007. – Минск. – Т. 1. – С.268-275.

4. Цуцаева, А.А. Криоконсервирование клеточных суспензий / А.А. Цуцаева [и др.]. – Киев: Навук. думка, – 1983. – 240 с.

5. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. / Б.А. Шендеров. – М.: Изд. Грантъ, 2001. – Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. – 288 с.

6. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.

7. Hammes, W.P. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* / W.P. Hammes, N. Weiss, W. Holzapfel // In: *The Prokaryotes*. – Balows A., Troper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (Eds.), 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY. – 1992. – P. 1535–1594.

8. Michetti, P. Lactobacilli for the management of *Helicobacter pylori* / P. Michetti // Nutrition. – 2001 – Vol. 17. – P. 268–269.

9. Tanaka, R. Clinical effects of bifidobacteria and lactobacilli / R. Tanaka // In: *Probiotics: prospects of the use in opportunistic infections*. – Fuller R. et al. (Eds.), Hrborn-Dill, Germany. – 1995. – P. 141–157.

10. Uzunova-Doneva, Ts. Anabiosis and conservation of microorganisms / Ts. Uzunova-Doneva, T. Donev // J. Cult. Coll. – 2004-2005. – Vol. 4 – P. 17–28.

*O.S. Pryshchepava, N.S. Kravchenko, S.B. Barunova, S.L. Vasylenko,
N.N. Furik*

STABILITY INVESTIGATION OF DIFFERENT LACTOBACILLUS SPECIES IN THE PROCESS OF FREEZING

Summary

The stability of nine *Lactobacillus* strains was determined in the two types of conservation: superfast freezing in liquid nitrogen or slower in the freezer. Bacterial cultures were grown on MRS and RSM-10 media. It is shown that lactobacilli can be divided into three groups according to the sensitivity to the low temperatures: the cultures with low sensitivity to freezing (survival rate is 98% and above), the cultures with medium sensitivity to freezing (survival rate is 80 - 95%), the cultures with high sensitivity to freezing (survival rate is below 80%).