

*В.А. Тарас, н.с., Н.К. Жабанос, к.т.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАЩИТНЫХ СРЕД НА СОХРАННОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ БИОМАССЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ ВИДА *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* В ПРОЦЕССЕ КРИОЗАМОРАЖИВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

*V. Taras, N. Zhabanos, N. Furyk
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

STUDY OF PROTECTIVE MEDIA INFLUENCE ON MICROORGANISMS KEEPING IN CONCENTRATED *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* BIOMASS IN THE PROCESS OF CRYOPELLETIZING AND STORAGE

e-mail: pobedit@tut.by, nzhabanos@tut.by, furik_nn@tut.by

*В статье приведены результаты исследований по подбору оптимального состава защитной среды для криоаморозки концентрированной биомассы штамма *Bifidobacterium longum* 432 OR в жидком азоте и последующего хранения замороженной концентрированной закваски. В результате исследований определена криопротекторная среда, обеспечивающая максимальную сохранность культуры в процессе криоконсервирования и последующего хранения, содержащая сахарозу, лактозу, натрий лимоннокислый, восстановленное обезжиренное молоко с 0,03% натрия лимоннокислого и инулином.*

*The article presents the results of studies about of the optimal composition of the protective medium for cryoconservation of *Bifidobacterium longum* 432 OR concentrated biomass. We froze concentrated biomass in liquid nitrogen and studied its survival in storage process. As a result of the research the cryoprotective medium was constructed. This medium contained sucrose, lactose, sodium citrate, skimmed milk with 0.03% sodium citrate and inulin and provided maximum preservation of starter culture during cryoconservation and further storage.*

Ключевые слова: концентрированная биомасса; бифидобактерий; *Bifidobacterium longum*; криопротекторные среды; криоаморозивание; концентрированная замороженная закваска.

Keywords: concentrated biomass; bifidobacteria; *Bifidobacterium longum*; cryoprotective media; cryoconservation; frozen concentrated started culture.

Введение. Производство кисломолочных продуктов с пробиотической направленностью основано на использовании культур микроорганизмов, которые вводятся в виде заквасок и концентрированных заквасок. Совершенствование технологии изготовления концентрированных заквасок является актуальной задачей, при этом, важное место в исследованиях занимает повышение активности концентрированных заквасок, унификация их свойств, экономичность производства. Мировой опыт показывает, что наибольшее распространение получили концентрированные закваски «прямого внесения», замороженные при низких температурах или получаемые методом сублимационной сушки. Применение таких заквасок исключает процедуру восстановления культур перед использованием, стадию перевивки культур в процессе хранения, что обеспечивает устойчивость в соотношении видов и штаммов микроорганизмов; эффективно в борьбе с бактериофагами, а также обеспечивает получение готовой продукции гарантированного качества [1–4].

Производство подобных концентрированных заквасок является динамично развивающимся сектором рынка микробиологических препаратов для пищевой промышленности. Исходной субстанцией культур микроорганизмов, поставляемых в виде заквасок, является микробная биомасса, которая после добавления защитной среды подвергается или сублимационной сушке или заморозке. Криозамораживание в жидком азоте при сверхнизкой температуре (-196°C) является одним из перспективных направлений обработки микробной биомассы и представляет собой один из наиболее удачных методов консервирования культур закваски [5–7]. При использовании сверхнизкой температуры молекулы воды не образуют крупные кристаллы, тем самым не повреждая клетку, биохимические процессы внутри клеток при этом прекращаются.[8–10] В процессе замораживания-размораживания возможны повреждения клеточной мембраны и аминокислотной транспортной системы клеток, но подобные повреждения клеток обратимы и полностью репарируются [11], особенно, при использовании культур в суспендированном виде [5,12]. За счет этого при замораживании бактериального концентрата в жидком азоте сохраняется высокий процент жизнеспособных клеток, не требующих дополнительных операций перед внесением в смесь для сквашивания [8–10]. Кроме того, при использовании данной технологии изготовления бакзаквасок отсутствует стадия сушки биомассы, что сокращает производственный цикл и снижает энергозатраты процесса производства.

Метод замораживания в жидком азоте позволяет получать концентрированную закваску со сроком хранения 1 год при температуре минус 45°C . Замороженные бактериальные закваски вносятся непосредственно в смесь для сквашивания, и, в отличие от сублимированных, имеют значительно меньшее время реактивации, что важно для производственного процесса [13, 14].

Следовательно, получение замороженных концентрированных заквасок для изготовления пробиотических кисломолочных продуктов является актуальной задачей и требует проведения экспериментальных работ с целью отработки технологии производства изготовления концентрированных заквасок, полученных криозамораживанием микробной биомассы.

В сохранении жизнеспособности клеток при замораживании и высушивании главную роль играют защитные среды. Механизм действия защитных сред основан на их способности создавать более прочные связи с молекулами воды, чем связи молекул воды между собой, что препятствует формированию правильной решетки льда и задерживает начало роста кристаллов [11].

Цель исследований – выбор оптимальной защитной среды, обеспечивающей максимальную сохранность бифидобактерий в процессе заморозки их бактериальной массы в жидком азоте и последующем хранении. Для достижения данной цели были реализованы следующие задачи:

- 1) определение количества бифидобактерий в смеси концентрированной биомассы с исследуемой защитной средой до криозаморозки;
- 2) определение количества бифидобактерий в замороженной концентрированной закваске;
- 3) определение количества бифидобактерий в замороженной концентрированной закваске после 4-ех месяцев хранения при температуре минус $(60\pm 1)^{\circ}\text{C}$
- 4) анализ полученных данных, выбор криопротектора, обеспечивающего наилучшую сохранность клеток бифидобактерий в процессе криозаморозки и последующего хранения.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись штамм бифидобактерий *Bifidobacterium longum* 432 OR, защитные среды для криозаморозки микробной массы данной культуры в парах жидкого азота.

Среды и реактивы.

Среда ГМК готовится из сухой питательной среды по описанию, приведенному на

упаковке.

Промышленная питательная среда для наращивания биомассы культуры Bifidobacterium longum готовится по ТИ ВУ 100098867.446 – 2016 [16].

Основные методы исследований.

Определение количества бифидобактерий.

Метод основан на высеве определенного количества биомассы с защитной средой и концентрированной замороженной закваски, и (или) их разведений в агаризованную питательную среду ГМК-1, культивировании посевов при оптимальных условиях и их подсчете.

Приготовление разведений.

1,0 г (см³) культуральной жидкости, биомассы, биомассы с защитной средой или концентрированной замороженной закваски предварительно размороженной при комнатной температуре, помещают в стерильную ступку, добавляют 9,0 см³ физиологического раствора и тщательно перемешивают. Таким образом получают (10⁻¹) разведение. В пробирку с 9,0 см³ физиологического раствора вносят 1 см³ (10⁻¹) разведения закваски и тщательно перемешивают. Таким образом получают (10⁻²) разведение. Повторяют эту операцию до получения необходимого количества разведений.

Подготовка питательной среды к проведению анализа.

Перед использованием питательную среду помещают в кипящую водяную баню и выдерживают в течение 15–20 мин для регенерации среды и затем среду охлаждают до (48±1)°С.

Посев и инкубация.

Для определения количества бифидобактерий засевают по 1 см³ из четырех последних разведений параллельно в две пробирки с высоким столбиком со средой ГМК-1, содержимое тщательно пассивно перемешивают стерильной пипеткой.

Посевы инкубируют при температуре (37±1)°С, в течение 5 сут.

Подсчет колоний и обработка результатов.

Учет результатов проводят путем подсчета количества выросших колоний. Для подсчета используют чашки Петри или пробирки, в которых выросло от 1 до 300 колоний. Количество бифидобактерий N, КОЕ/г(см³), определяют по формуле 1.

$$N = \frac{\sum_{i=2}^k c_i + 10 \cdot \sum_{j=2}^m c_j + 100 \cdot \sum_{l=2}^p c_l}{n \cdot d}, \quad (1)$$

где c_{2,k} – количество колоний, подсчитанных в самом низком разведении;

c_{2,m} – количество колоний, подсчитанных в разведении, следующем за самым низким;

c_{2,p} – количество колоний, подсчитанных в следующем разведении;

n – суммарное количество чашек или пробирок, взятых для подсчета;

d – величина самого низкого разведения, взятого для подсчета.

Результаты и их обсуждение. Анализ динамики количества бифидобактерий в ходе технологического процесса изготовления закваски замороженной концентрированной на основе штамма *Bifidobacterium longum* 432 OR показал, что максимальное уменьшение их количества происходило на стадии замораживания. В связи с этим проведено изучение влияния состава защитных сред для криоконсервации в жидком азоте. Основываясь на эмпирических и литературных данных для рассмотрения в качестве основных компонентов защитных сред были выбраны экономически доступные в производственных масштабах, хорошо растворимые в воде, нетоксичные, не

требующие последующего отмывания вещества: сахароза, глюкоза, лактоза, натрий лимоннокислый, инулин, восстановленное обезжиренное молоко.

Исследовано криопротекторное действие защитных сред следующего состава (концентрация веществ указана в смеси биомассы с защитной средой без учета разбавления):

- 1) 5% сахарозы + 1% натрия лимоннокислого;
- 2) 5% сахарозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с добавлением 3% инулина;
- 3) 5% лактозы + 1% натрия лимоннокислого;
- 4) 5% лактозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с добавлением 3% инулина;
- 5) 2,5% сахарозы + 1,5 % лактозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% ВОМ (14%-ого) с 0,03% натрия лимоннокислого и добавлением 3% инулина.

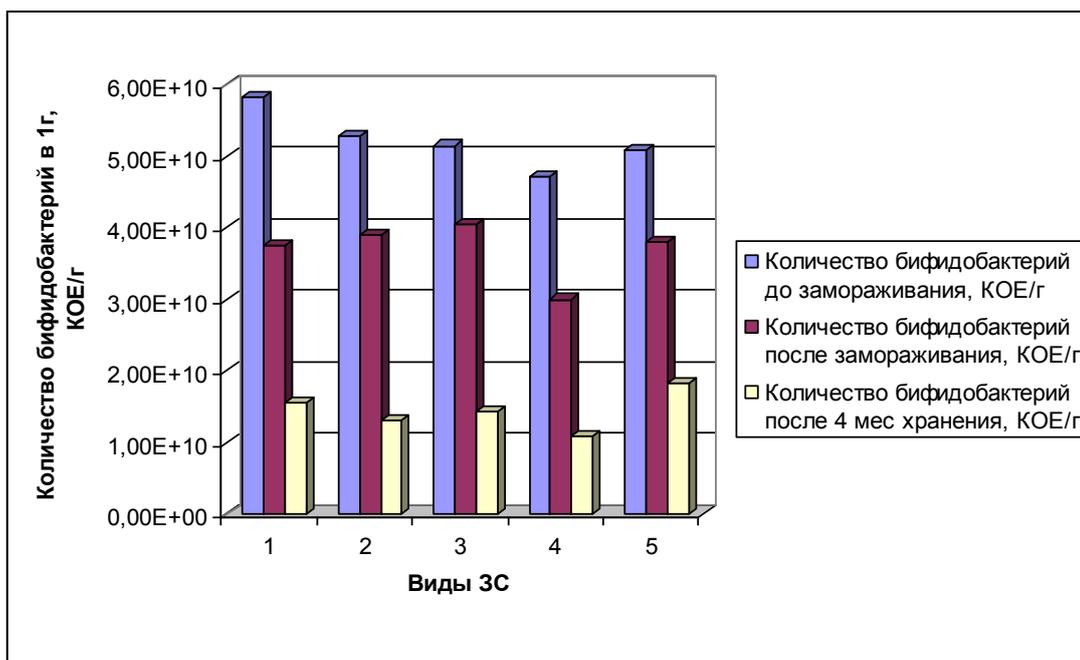
Вещества защитной среды вносили в биомассу в виде концентрированных стерильных растворов. Использовали раствор сахарозы с концентрацией 500 г/дм³, растворы лактозы и раствор натрия лимоннокислого с концентрацией 200 г/дм³.

Биомасса бифидобактерий получена в результате культивирования микроорганизмов в промышленном ферментере объемом 150 дм³ на участке бакзаквасок и биоконсервантов отдела биотехнологий РУП «Институт мясо-молочной промышленности». Накопление биомассы осуществляли на промышленной питательной среде на основе гидролизата восстановленного обезжиренного молока по технологии, приведенной в ТИ ВУ 100098867.446-2016 [15]. Концентрирование культуральной жидкости проводили на сепараторе марки GEA FSC 20-06-076.

Полученную биомассу разделили на 5 равных частей и в асептических условиях смешали с концентрированными растворами защитных сред согласно схеме, приведенной ранее. Бактериальную массу, смешанную с защитной средой, подавали стерильно на установку криозамораживания, где в жидком азоте происходило образование замороженных гранул. Замороженные гранулы расфасовали в мешки, промаркировали, плотно укупили и отправили на хранение в морозильные шкафы, где они хранились при температурном режиме минус (60±1)°С. Для определения влияния питательной среды на выживаемость бифидобактерий проводили определение их количества до и после криозаморозки, а также через 4 месяца хранения при температурном режиме минус (60±1)°С. Данные представлены на рисунке 1.

Как видно из рис. 1, снижение количества бифидобактерий при замораживании в жидком азоте было минимальным при использовании в качестве защитной среды №3 (5% лактозы с 1% натрия лимоннокислого) и защитной среды №5, применяемой при криозамораживании лактококков (2,5% сахарозы + 1,5 % лактозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с добавлением 3% инулина).

Для оценки влияния исследуемых защитных сред на выживаемость бифидобактерий при температурном режиме минус (60±1)°С определяли их количество в замороженной концентрированной закваске через 4 месяца хранения. Установлено, что максимальное снижение количества бифидобактерий (в 3,00 раза) в процессе хранения происходит при использовании в качестве защитной среды №2 (5% сахарозы+ 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с добавлением 3% инулина). В случаях применения криопротекторных сред №1 (5% сахарозы + 1% натрия лимоннокислого), №3 (5% лактозы + 1% натрия лимоннокислого) и №4 (5% лактозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с 0,03% натрия лимоннокислого и 3% инулина) количество микроорганизмов при хранении снизилось соответственно в 2,42; 2,83 и 2,75 раз. Максимальную сохранность количества бифидобактерий обеспечивала защитная среда №5 (2,5% сахарозы + 1,5 % лактозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с 0,03% натрия лимоннокислого и 3% инулина). При ее



- 1 - 5% сахарозы + 1% натрия лимоннокислого;
 2 - 5% сахарозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с добавлением 3% инулина;
 3 - 5% лактозы + 1% натрия лимоннокислого;
 4 - 5% лактозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% стерильного 14% ВОМ с 0,03% натрия лимоннокислого и 3% инулина;
 5 - 2,5% сахарозы + 1,5 % лактозы + 1% натрия лимоннокислого + 12% ВОМ (14%-ого) с 0,03% натрия лимоннокислого и 3% инулина.

Рисунок 1 – Определение влияния различных видов защитных сред на выживаемость бифидобактерий в процессе криозамораживания и хранения

использовании количество бифидобактерий в замороженной концентрированной закваске за 4 месяца хранения снизилось в 2,08 раз. Все исследованные образцы после 4 месяцев хранения по показателю качества «количество бифидобактерий в 1 г закваски» соответствовали требованиям ТНПА.

Вывод. В результате проведенных исследований установлено, что наилучшую сохранность концентрированной биомассы штамма *Bifidobacterium longum* 432 OR в процессе криозаморозки в жидком азоте и последующем хранении в течение 4 месяцев при температурном режиме минус $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ обеспечивала защитная среда №5, содержащая сахарозу, лактозу, натрий лимоннокислый, восстановленное обезжиренное молоко с добавлением натрия лимоннокислого и инулина.

Список использованных источников

1. Шрамко, М.И. Научно-практическое обоснования новых бактериальных концентратов с криозамораживанием микробной биомассы для получения кормовых добавок пробиотического действия на основе вторичного молочного сырья при выращивании телят-молочников: дисс. ... к.б.н.: 06.02.10/ М.И. Шрамко; Поволжск. науч.-исслед.ин-т производстваи переработки мясомолочной продукции РАСХН. – Волгоград, 2011. – 139 л.

Shramko, M.I. Nauchno-prakticheskoe obosnovaniya novyh bakterial'nyh konzentratov s kriozamorazhivaniem mikrobnoy biomassy dlja polucheniya kormovyh dobavok probioticheskogo dejstviya na osnove vtorichnogo molochnogo syr'ja pri vyrashhivanii teljat-molochnikov [The scientific and practical justification of new concentrated starter cultures with cryofreezing of microbial biomass for receiving feed additives of pro-biotic action on the basis of secondary lactic raw materials at breeding of calfs]: diss. ... k.b.n.: 06.02.10/ M.I. Shramko; Povolzhsk. nauch.-issled.in-t proizvodstvai pererabotki mjasomolochnoj produkcii RASHN. – Volgograd, 2011. – 139 l.

2. Семенихина, В.Ф. Особенности использования бифидобактерий при производстве пробиотических кисломолочных продуктов / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, А.В. Бегунова // Наука производству: инф. Бюллетень / ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии. – М., 2011. – №2. – С.15–17.

Semenihina, V.F. Osobennosti ispol'zovaniya bifidobakterij pri proizvodstve probioticheskikh kislomolochnykh produktov [The features of use of bifidobacteria by production of pro-biotic fermented milk products] / V.F. Semenihiina, I.V. Rozhkova, A.V. Begunova // Nauka proizvodstvu: inf. B'ulleten' / GNU VNIMI Rossel'hozakademii. – M., 2011. – №2. – S.15–17.

3. Тумунова, С.Б. Разработка технологии производства сухого концентрата бифидобактерий автореф. дис. ... канд. техн. наук: 637.146.33 / С.Б. Тумунова; ГНУ ВСГТУ РАСХН. – Улан-Уде, 1995. – 20 с.

Tumunova, S.B. Razrabotka tehnologii proizvodstva suhogo koncentrata bifidobakterij [Development of the production technology of the freeze-dried concentrated starter culture of bifidobacteria] avtoref. dis. ... kand. tehn. nauk: 637.146.33 / S.B. Tumunova; GNU VSGTU RASHN. – Ulan-Ude, 1995. – 20 s.

4. Хамагаева, И.С. Научные основы биотехнологии кисломолочных продуктов для детского и диетического питания: монография / И.С. Хамагаева. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 279 с.

Hamagaeva, I.S. Nauchnye osnovy biotehnologii kislomolochnykh produktov dlja detskogo i dieticheskogo pitaniya [Scientific bases of biotechnology of fermented milk products for a children's and dietary food]: monografija / I.S. Hamagaeva. – Ulan-Udje: Izd-vo VSGTU, 2005. – 279 s.

5. Крусь, Г.Н. Технология молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусь, А.Г. Храмов, З.В. Волокитина, С.В. Карпычев; под ред. А.М. Шалыгиной. – М: Колос, 2004. – 455 с.

Krus', G.N. Tehnologija moloka i molochnykh produktov [Technology of milk and dairy products] / G.N. Krus', A.G. Hramcov, Z.V. Volokitina, S.V. Karpychev; pod red. A.M. Shalyginov. – M: Kolos, 2004. – 455 s.

6. Цуцаева, А.А. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов / А.А. Цуцаева, А.Е. Ананьина, Л.М. Бальбердина, Л.В. Степанюк, Н.В. Павленко // Микробиология. – 2008. – Т.77, №5. – С.696–700.

Cucaeva, A.A. Opyt dolgosrochnogo hranenija promyshlennykh shtammov mikroorganizmov [Experience of long-term storage of the industrial strains of microorganisms] / A.A. Cucaeva, A.E. Anan'ina, L.M. Balyberdina, L.V. Stepanjuk, N.V. Pavlenko // Mikrobiologija. – 2008. – T.77, №5. – S.696–700.

7. Романова, Э.В. Характеристика штаммов лактобактерий / Э.В. Романова, Р.Г. Кабисов, Б.Г. Цугкиев // Молочная промышленность. – 2009. – № 2. – С. 43.

Romanova, Je.V. Harakteristika shtammov laktobakterij [Characteristic of strains Lactobacillus] / Je.V. Romanova, R.G. Kabisov, B.G. Cugkiev // Molochnaja promyshlennost'. – 2009. – № 2. – S. 43.

8. Вирник, А.Д. Декстран и его производные / А.Д. Вирник, К.П. Хомяков, И.Ф. Скокова // Успехи химии. – 1975. – № 44. – С. 1280.

Virnik, A.D. Dekstran i ego proizvodnye [Dextran and its derivants] / A.D. Virnik, K.P. Homjakov, I.F. Skokova // Uspеhi himii. – 1975. – № 44. – S. 1280.

9. Артюхов, И.В. Криосохранение крупных биологических объектов [Электронный ресурс] / И.В. Артюхов, А.В. Карнаухов // Журнал «Биология». – 2003. – №43 Режим доступа: http://bio.1september.ru/view_article.php?ID=200304301. – Дата доступа: 30.03.2017.

Artjuhov, I.V. Kriosohranenie krupnykh biologicheskikh ob'ektov [Cryopreservation of large biological objects] [Jelektronnyj resurs] / I.V. Artjuhov, A.V. Karnauhov // Zhurnal «Biologija». – 2003. – №43 Rezhim dostupa: http://bio.1september.ru/view_article.php?ID=200304301. – Data dostupa: 30.03.2017.

10. Fernandez Murga, M. L. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of Lactobacillus acidophilus // M.L. Fernandez Murga, G.M. Cabrega, G.F. De Valdez, A. Disalvo, A.M. Seldes // Journal of applied microbiology. – 2000. – Vol. 88, №2. – P. 342–348.

11. Цуцаева, А.А. Криобиология и биотехнология / А.А.Цуцаева [и др.] – Киев: Навукова думка, 1987. – 214с.

Cucaeva, A.A. Kriobiologija i biotehnologija [Cryobiology and biotechnology] / A.A.Cucaeva [i dr.] – Kiev: Navukova dumka, 1987. – 214 s.

12. Hubalec, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms / Z. Hubalec // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, №3. – P. 205–229.

13. Тамим, А.И. Йогурты и аналогичные кисломолочные продукты: научные основы и технологии / А.И. Тамим, Р.К. Робинсон – СПб: Профессия, – 2003. – 664 с.

Tamim, A.I. Jogurty i analogichnye kislomolochnye produkty: nauchnye osnovy i tehnologii [Yogurts and similar fermented milk products: scientific bases and technologies] / A.I. Tamim, R.K. Robinson – SPb: Professija, 2003. – 664 s.

14. Кузьмина О.М. Исследование влияния состава защитной среды на эффективность процесса криозамораживания микроорганизмов: дисс. ... к.т.н.: 05.18.04 / О.М.Кузьмина. – Москва, 2010. – 128 с.

Kuz'mina, O.M. Issledovanie vlijaniya sostava zashhitnoj sredy na jeffektivnost' processa kriozamorazhivaniya mikroorganizmov [The research of influence of structure of a protective medium on effectiveness of process of cryofreezing of microorganisms]: diss. ... k.t.n.: 05.18.04 / O.M.Kuz'mina. – Moskva. 2010. – 128 s.

15. Технологическая инструкция по изготовлению закваски замороженной концентрированной бифидобактерий. Технологическая инструкция: ТИ ВУ 100098867.446 – 2016.: Введ. 03.11.2016 (введена впервые). – Минск: РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 2016. – 51 с.

Tehnologičeskaja instrukcija po izgotovleniju zakvaski zamorožhennoj koncentrirovannoj bifidobakterij. Tehnologičeskaja instrukcija [The technological instruction for manufacture of the the frozen concentrated starter culture bifidobacteria. The technological instruction]: ТИ ВУ 100098867.446 – 2016.: Vved. 03.11.2016 (vvedena v pervye). – Minsk: RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti», 2016. – 51 s.