

УДК 579.672

UDC 579.672

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И ВЫСУШИВАНИЯ КЛЕТОК *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS***

**OPTIMIZATION OF COMPOSITION CULTURE MEDIA, TECHNIQUE OF CONCENTRATING AND FREEZE DRYING CONDITIONS FOR CELL OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS***

Лысенко Юрий Андреевич  
канд. биол. наук, старший преподаватель

Lysenko Yury Andreevich  
Cand.Biol.Sci., senior lecturer

Лунева Альбина Владимировна  
канд. биол. наук, ассистент

Luneva Albina Vladimirovna  
Cand.Biol.Sci., assistant

Волкова Светлана Андреевна  
канд. биол. наук, доцент

Volkova Svetlana Andreevna  
Cand.Biol.Sci., assistant professor

Николаенко Самвел Николаевич  
канд.тех.наук, доцент

Nikolaenko Samvel Nikolaevich  
Cand. Tech.Sci., assistant professor

Петрова Виктория Вячеславовна  
студент  
*Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия*

Petrova Victoria Vyacheslavovna  
student  
*Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia*

Данная статья изучает взаимосвязь между составом питательной среды, способом концентрирования и условиями лиофилизации клеток *Lactobacillus acidophilus*. Показано, что питательная среда на основе молочной сыворотки и обогащенная томатным соком обладает выраженным ростостимулирующими свойствами. Данная питательная среда позволяет обеспечить максимальное сохранение количества жизнеспособных клеток при лиофильном высушивании культуры *Lactobacillus acidophilus*

This study has investigated the relationship between culture media, technique of concentrating and freeze drying conditions for the cells of *Lactobacillus acidophilus*. The study has demonstrated that milk whey tomato juice-enriched medium has the high-growth properties. This medium allows ensuring high freeze drying survival of *Lactobacillus acidophilus*

Ключевые слова: ЛИОФИЛИЗАЦИЯ МОЛОЧНО-КИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ, МЕТОД ВЫСУШИВАНИЯ, СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК, МОЛОЧНАЯ СЫВОРОТКА, ТОМАТНЫЙ СОК

Keywords: FREEZE-DRIED LACTIC ACID BACTERIA, OPTIMIZATION, DRYING METHOD, SURVIVAL, WHEY, TOMATO JUICE

Состав микрофлоры кисломолочного продукта определяет его вкусовые качества и играет большую роль в их формировании [3]. Продукты с использованием ацидофильной палочки известны давно и актуальны в современных условиях [5]. Для производства кисломолочных продуктов, в том числе пробиотиков, используются бактериальные закваски и концентраты [6; 7; 11; 12]. Бактериальные концентраты молочнокислых микроорганизмов в настоящее время являются основным элементом технологии производства всех ферментированных молочных продуктов.

Для производства различных молочных продуктов используются как монокультуры, так и консорциумы микроорганизмов [1; 2; 9]. Как известно, ацидофильная палочка входит в состав заквасок для производства молочнокислых продуктов, повышая их биологическую ценность. Также культуры ацидофильной палочки в сочетании с культурами термофильного стрептококка широко используются при производстве йогурта, различных видов кисломолочных напитков (простокваши, ряженки). Сквашивание молока при производстве казеина осуществляется бактериальным препаратом, приготовленным на чистых культурах молочнокислых палочек [3; 8; 13; 14].

Бактерии рода *Lactobacillus* относятся к микроорганизмам, имеющим сложные питательные потребности. Для их активного развития требуется наличие веществ, необходимых для построения бактериальной клетки (нуклеиновых кислот, полисахаридов, аминсахаров и т.д.). Так, для роста большинства молочнокислых палочек необходимы органические формы азота, которые они сами не синтезируют [4; 10]. Многим видам лактобацилл для развития необходимы витамины. Этим объясняется значительное влияние на их рост добавок к питательной среде различных экстрактов (например, дрожжевого, кукурузного), а также других соединений. В целом, питательная среда должна удовлетворять потребностям молочнокислых палочек в источниках энергии, содержать компоненты, необходимые для конструктивного метаболизма [15].

Таким образом, выращивание молочнокислых микроорганизмов и получения их лиофилизированных форм является сложным процессом, на который оказывает влияние большое количество факторов, кроме того, он связан с необходимостью решения ряда научных и технических проблем, частью которых является совершенствование состава питательной среды.

**Материал и методика.** Исследования проводились на кафедре биотехнологии, биохимии и биофизики, факультета перерабатывающих технологий Кубанского госагроуниверситета.

Для исследований использовали лабораторную культуру *Lactobacillus acidophilus* РКМБ. Опытной питательной средой служила сыворотка из цельного молока, обогащённая экстрактом томатного сока. В качестве контроля использовали питательную среду для выращивания молочнокислых микроорганизмов – гидролизованное молоко, приготовленное согласно ГОСТ 10444.11-89. Культивирование объекта осуществляли на лабораторном ферментере «Ока-05К», концентрирование на центрифуге, высушивание в сублимационной установке CHRIST BETA 2–8 LD plus.

При культивировании и концентрировании микроорганизма *Lactobacillus acidophilus* посев в чашки Петри проводили согласно ГОСТ 10444.11-89 (пункт 4.2.2), а подсчёт количества выросших колоний – ГОСТ 9225-84 (пункт 4.5.3).

Изучение органолептических, физико-химических и микробиологических показателей высушенной культуры проводили в соответствии с требованиями ТУ 9229-102-04610209-2002 – «Концентраты бактериальные лиофилизированные для ферментированных молочных продуктов» и СанПиН 2.3.2.1078 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», а методы их исследования согласно ГОСТов (табл. 1).

**Таблица 1 – Показатели качества бакконцентрата и методы их исследования**

Показатель	Метод	ТУ/ГОСТ
<b>Органолептические показатели</b>		
Внешний вид и цвет	Метод определения внешнего вида и цвета	ТУ 9229-102-04610209-2002
<b>Физико-химические показатели</b>		
Массовая доля влаги	Метод определения влажности	ГОСТ 24061-89
Кислотообразующая активность	Титриметрические методы определения кислотности (потенциометрический)	ГОСТ 3624-92
<b>Микробиологические показатели</b>		
Количество жизнеспособных <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Метод микробиологического анализа (приготовление разведения для посева)	ГОСТ 9225-84 (пункт 3.4.3)
	Методы определения молочнокислых микроорганизмов	ГОСТ 10444.11-89 (пункт 4.2.2)
	Метод микробиологического анализа (подсчет количества клеток)	ГОСТ 9225-84 (пункт 4.5.3)
Количество дрожжей и плесеней	Метод определения дрожжей и плесневых грибов	ГОСТ 10444.12-88
Определение БГКП	Метод определения бактерий группы кишечных палочек	ГОСТ 9225-84 (пункт 4.6)
Определение <i>S. aureus</i>	Методы определения <i>S. aureus</i> (без предварительного обогащения)	ГОСТ 30347-97

**Обсуждение результатов.** Для получения маточной (засевной) культуры *Lactobacillus acidophilus* 5 % лабораторной закваски (культуры) данного микроорганизма, в стерильном боксе, вносили в питательную среду объёмом 1 л на основе молочной сыворотки. Культивирование осуществляли в течении 18 ч. при температуре 34 °С в термостате.

Далее маточную культуру в количестве 10 % к объёму ферментера переносили в предварительно простерилизованную ёмкость, содержащую молочную сыворотку, обогащённую экстрактом томатного сока и культивировали в течении 24 ч, при температуре 34 °С.

Для оценки оптимального варианта питательной среды в период выращивания данного микроорганизма провели опыты по его культивированию с различным составом и оценивали титр выросших микроорганизмов. Данные исследований представлены в таблице 2.

**Таблица 2 – Состав питательных сред и титр клеток после культивирования**

Показатель	Вариант питательной среды					
	контроль	1	2	3	4	5
Компоненты питательной среды, %						
Гидролизованное молоко	100	–	–	–	–	–
Молочная сыворотка	–	100	95	90	85	80
Экстракт томатного сока	–	–	5	10	15	20
Количество микроорганизмов						
Титр, КОЕ/мл	$7,3 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$

Как видно из данных, представленных в таблице 2, оптимальной питательной средой для культивирования является вариант № 4, который содержит молочную сыворотку, обогащенная экстрактом томатного сока в количестве 15 % от общего объема среды, так как в варианте № 1, где использовали только молочную сыворотку, а также № 2 и 3 – с меньшим содержанием экстракта томатного сока титр микроорганизмов ниже. В варианте № 5 титр клеток был не на много выше, чем в № 4, а увеличение концентрации экстракта томатного сока приводит к удорожанию питательной среды.

Таким образом, для дальнейшего изучения влияния оптимальной питательной среды при лиофилизации использовали контрольный вариант с гидролизированным молоком и опытный с молочной сывороткой, обогащенной экстрактом томатного сока в количестве 15 % от общего объема среды.

По окончанию процесса выращивания культуральную среду охлаждали до температуры  $(8 \pm 2)$  °С и направляли на концентрирование. Перед работой части центрифуги (пробирки), соприкасающиеся с культуральной жидкостью, стерилизовали этиловым спиртом. Степень отделения бактериальных клеток от среды контролировали по прозрачности жидкости, отходящей от биомассы клеток, и микроскопией ее препарата. Надосадочную жидкость сливали, а к осадку добавляли культивируемую

суспензию клеток. Процесс повторяли несколько раз для максимального получения биомассы клеток.

После концентрирования был проведен подсчет титра клеток *Lactobacillus acidophilus* в изучаемых питательных средах (табл. 3).

Таблица 3 – Состав питательных сред и титр клеток после концентрирования

Показатель	Вариант питательной среды	
	контроль	4
Компоненты питательной среды, %		
Гидролизованное молоко	100	–
Молочная сыворотка	–	85
Экстракт томатного сока	–	15
Количество микроорганизмов		
Титр, КОЕ/мл	$8,1 \times 10^9$	$4,3 \times 10^{10}$

Из таблицы 3 видно, что на питательной среде с молочной сывороткой, обогащенной экстрактом томатного сока в количестве 15 % от общего объема, количество живых микроорганизмов после концентрирования оставалось выше, чем в контрольном варианте.

Далее биомассу клеток в двух вариантах разливали в стерильные чашки Петри толщиной слоя ( $5 \pm 1$ ) мм и осуществляли замораживание суспензии при температуре ( $-60 \pm 2$ ) °С в течение ( $1,5 \pm 0,5$ ) ч.

Замороженную бактериальную суспензию помещали в асептических условиях в заранее подготовленную сублимационную сушилку и высушивали в течении  $24 \pm 1$  ч.

Лиофилизированную (сухую) бактериальную культуру в стерильных условиях измельчали в порошок в стерильной ступке, помещали в стерильную емкость и направляли в холодильную камеру, где выдерживают при температуре 5–7 °С до окончания исследований его свойств.

Результаты исследования титра *Lactobacillus acidophilus* после высушивания на изучаемых питательных средах представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Состав питательных сред и титр клеток после лиофилизации

Показатель	Вариант питательной среды	
	контроль	4
Компоненты питательной среды, %		
Гидролизованное молоко	100	–
Молочная сыворотка	–	85
Экстракт томатного сока	–	15
Количество микроорганизмов		
Титр, КОЕ/г	$7,3 \times 10^7$	$5,8 \times 10^8$

Из таблицы 4 видно, что количество жизнеспособных клеток после высушивания было выше в варианте, где основу питательной среды составляла молочная сыворотка, обогащенная экстрактом томатного сока в количестве 15 % от общего объема.

Далее концентрат в стерильных условиях фасовали в стерильные флаконы, закрывали стерильными резиновыми пробками и закатывали алюминиевыми колпачками.

Результаты изучения показателей качества полученного бактериального концентрата представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Показатели качества полученного моновидного бакконцентрата

Показатель	Характеристика и значение
<b>Органолептические показатели</b>	
Внешний вид	Однородная порошкообразная масса
Цвет	Светло-молочный
<b>Физико-химические показатели</b>	
Массовая доля влаги, %	4,1
Кислотообразующая активность, °Т	
– при выпуске	9,2
– в течение срока годности:	
– через 2 мес.	8,1
– через 4 мес.	6,6
– через 6 мес.	4,5
– через 7 мес.	3,2
<b>Микробиологические показатели</b>	
Титр <i>Lactobacillus acidophilus</i> , КОЕ/г	
– при выпуске	$5,8 \times 10^8$
– в течение срока годности:	
– через 2 мес.	$3,2 \times 10^8$
– через 4 мес.	$9,5 \times 10^7$
– через 6 мес.	$5,3 \times 10^7$
– через 7 мес.	$8,4 \times 10^6$
Количество дрожжей и плесеней, КОЕ/г	Не обнаружено
Бактерии группы кишечных палочек	Не обнаружено
<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено

Изучение органолептических показателей моновидного бактериального концентрата (внешний вид и цвет) проводили визуально при дневном рассеянном свете. Бакконцентрат, выращенный на сыворотке, обогащенной экстрактом томатного сока в стерильном флаконе представляет собой однородную порошкообразную массу. Цвет бактериальных концентратов не влияет на качество продукта и зависит, непосредственно, от состава питательной среды. Выращенная и высушенная нами культура имела светло-молочный цвет. Посторонних включений, примесей и других инородных тел обнаружено не было.

Влажность бактериального концентрата определяли уменьшением его массы после высушивания в течении 1 ч при температуре 105 °С. Среднее арифметическое значение показателя, полученное в трех параллельных определениях составило 4,1 %, что находится в пределах нормы для сухих бактериальных концентратов.

Кислотообразующую активность бактериального концентрата определяли по нарастанию титруемой кислотности путем его активизации при выпуске и в течение срока хранения продукта. Среднее арифметическое значение изучаемого показателя, полученное в двух параллельных определениях при выпуске продукта составило 9,2 °Т, что находится в пределах нормы для сухих бактериальных концентратов.

При изучении кислотообразующей активности бактериального концентрата через 2; 4 и 6 месяцев, среднее арифметическое значение изучаемого показателя, полученное в двух параллельных определениях, соответственно, составило 8,1; 6,6 и 4,5 °Т, что находится в пределах нормы для сухих бактериальных концентратов. Однако, на седьмой месяц значение данного показателя составило 3,2 °Т, что ниже требований для молочнокислых бактериальных концентратов. Соответственно, чем ниже кислотообразующая активность, тем ниже титр молочнокислых микроорганизмов при активизации, что подтверждают также данные ис-



следования титра *Lactobacillus acidophilus* в течение срока годности продукта. Так, титр *Lactobacillus acidophilus* на седьмой месяц хранения с  $5,8 \times 10^8$  уменьшился до  $8,4 \times 10^6$  КОЕ/г, что снижает ценность продукта. Следовательно, наиболее оптимальный срок хранения бактериального концентрата составляет в течение 6 месяцев.

Для изучения микробиологической чистоты бактериального концентрата молочнокислые микроорганизмы дифференцировали от дрожжей и плесени на питательной среде, основу которой составляет сывороточный агар БФ в комплексе с антибиотиком левомецетином. При этом на питательной среде после культивирования не было выявлено роста колоний и появления мицелия, характеризующие дрожжи и плесневые грибы.

Для изучения наличия в концентрате бактерий группы кишечных палочек использовали питательную среду с лактозой, которую данные микроорганизмы используют в качестве источника питания с образованием продуктов метаболизма – кислоты и газа. Через сутки после культивирования в термостате, в изучаемых пробирках, куда производили посев концентрата, не было выявлено газообразования, что свидетельствует об отсутствии бактерий группы кишечных палочек.

Для изучения наличия в бактериальном концентрате *Staphylococcus aureus* использовали плотную питательную среду на основе молочно-солевого агара. Посевы инкубировали при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24–48 ч. После термостатирования на чашках Петри не было выявлено роста колоний, характеризующие золотистого стафилококка.

Таким образом, моновидовой бактериальный концентрат *Lactobacillus acidophilus*, выращенный на питательной среде, основу которой составляет молочная сыворотка, обогащенная экстрактом томатного сока в количестве 15 %, соответствует требованиям, предъявляемые к данному продукту и может использоваться для получения молочнокислых продуктов.

**Вывод.** Использование питательной среды на основе молочной сыворотки, обогащенной экстрактом томатного сока в количестве 15 % от общего объема среды обладает выраженным ростостимулирующим свойством для *Lactobacillus acidophilus* и является хорошей основой для максимального сохранения количества жизнеспособных клеток при сушивании культуры.

### Список литературы

1. Ассортимент бактериальных концентратов и заквасок для сыров и других молочных продуктов. Углич, 2005. – 30 с.
2. Бахнова Н. В., Анищенко И. П. Бактериальные концентраты непосредственного внесения для производства молочных продуктов // Сб. материалов международного специализированного научно-практического семинара «Бактериальные закваски и биологические средства, применяемые в производстве ферментированных молочных продуктов в России». – Углич, 2005. – С. 80-81.
3. Бахнова Н. В. Новые перспективные бакконцентраты Барнаульской биофабрики / Н. В. Бахнова, И. П. Анищенко // Сыроделие и маслоделие. – 2005. – № 1. – С. 13-14.
4. Горбатова К. К. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов / К. К. Горбатова // СПб.: ГИОРД. – 2003. – 352 с.
5. Квасников Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасникова, О. А. Нестеренко // М.: Наука. – 1975. – 384 с.
6. Лысенко Ю. А. Влияние пробиотиков на мясную и яичную продуктивность перепелов / Ю. А. Лысенко // Труды КубГАУ. – 2012. – № 5 (38). – С. 145-148.
7. Лысенко Ю. А. Повышение биологического потенциала перепелок-несушек при использовании пробиотических кормовых добавок / Ю. А. Лысенко, А. И. Петенко // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 5. – С. 5-7.
8. Молочная индустрия мира и Российской Федерации (Ежедневник – 2007), М., 2007. – 100 с.
9. Перфильев Г. Д., Свириденко Ю. Я. Производство и применение бактериальных концентратов / Г. Д. Перфильев, Ю. Я. Свириденко // Сыроделие и маслоделие. – 2006. – № 3. – 24 с.
10. Перфильев Г. Д. Бактериальные закваски и концентраты в биотехнологии сыроделия. Научные и практические аспекты // Сб. материалов международного специализированного научно-практического семинара «Бактериальные закваски и биологические средства, применяемые в производстве ферментированных молочных продуктов в России». – Углич, 2005. – С. 9-14.
11. Петенко А. И. Кормовые добавки в рационах перепелов / А. И. Петенко, Ю. А. Лысенко // Птицеводство. – 2012. – № 9. – С. 36-38.
12. Петенко А. И. Особенность формирования микробиоценозов ЖКТ и эффективность обменных процессов у перепелов при использовании пробиотических кормовых добавок / А. И. Петенко, Ю. А. Лысенко // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 4. – С. 24-26.
13. Сергеев В. Н. Молочная промышленность в условиях рынка / В. Н. Сергеев // Молочная промышленность. – 1996. – № 1. – С. 3-7.

14. Сорокина Н. П. Бактериальные концентраты / Н. П. Сорокина // Сыроделие и маслоделие. – 2004. – № 3. – 16 с.

15. Сорокина Н. П. Ассортимент бактериальных концентратов «Экспериментальной биофабрики» ВНИИМС // Сб. материалов международного специализированного научно-практического семинара «Бактериальные закваски и биологические средства, применяемые в производстве ферментированных молочных продуктов в России». – Углич, 2005. – с.76-79.

### References

1. Assortiment bakterial'nyh koncentratov i zakvasok dlja syrov i drugih molochnyh produktov. Uglich, 2005. – 30 s.

2. Bahnova N. V., Anishhenko I. P. Bakterial'nye koncentraty neposredstvennogo vnesenija dlja proizvodstva molochnyh produktov // Sb. materialov mezhdunarodnogo specializirovannogo nauchno-prakticheskogo seminaru «Bakterial'nye zakvaski i biologicheskie sredstva, primenjaemye v proizvodstve fermentirovannyh molochnyh produktov v Rossii». – Uglich, 2005. – S. 80-81.

3. Bahnova N. V. Novye perspektivnye bakkoncentraty Barnaul'skoj biofabriki / N. V. Bahnova, I. P. Anishhenko // Syrodelle i maslodelie. – 2005. – № 1. – S. 13-14.

4. Gorbatova K. K. Fiziko-himicheskie i biohimicheskie osnovy proizvodstva molochnyh produktov / K. K. Gorbatova // SPb.: GIORD. – 2003. – 352 s.

5. Kvasnikov E. I. Molochnokislye bakterii i puti ih ispol'zovanija/ E. I. Kvasnikova, O. A. Nesterenko // M.: Nauka. – 1975. – 384 s.

6. Lysenko Ju. A. Vlijanie probiotikov na mjasnuju i jaichnuju produktivnost' perepelov / Ju. A. Lysenko // Trudy KubGAU. – 2012. – № 5 (38). – S. 145-148.

7. Lysenko Ju. A. Povyshenie biologicheskogo potenciala perepelok-nesushek pri ispol'zovanii probioticheskikh kormovyh dobavok / Ju. A. Lysenko, A. I. Petenko // Veterinarija Kubani. – 2012. – № 5. – S. 5-7.

8. Molochnaja industrija mira i Rossijskoj Federacii (Ezhednevnik – 2007), M., 2007. – 100 s.

9. Perfil'ev G. D., Sviridenko Ju. Ja. Proizvodstvo i primenenie bakterial'nyh koncentratov / G. D. Perfil'ev, Ju. Ja. Sviridenko // Syrodelle i maslodelie. – 2006. – № 3. – 24 s.

10. Perfil'ev G. D. Bakterial'nye zakvaski i koncentraty v biotehnologii syrodellija. Nauchnye i prakticheskie aspekty // Sb. materialov mezhdunarodnogo specializirovannogo nauchno-prakticheskogo seminaru «Bakterial'nye zakvaski i biologicheskie sredstva, primenjaemye v proizvodstve fermentirovannyh molochnyh produktov v Rossii». – Uglich, 2005. – S. 9-14.

11. Petenko A. I. Kormovye dobavki v racionah perepelov / A. I. Petenko, Ju. A. Lysenko // Pticevodstvo. – 2012. – № 9. – S. 36-38.

12. Petenko A. I. Osobennost' formirovanija mikrobiocenzov ZhKT i jeffektivnost' obmennyh processov u perepelov pri ispol'zovanii probioticheskikh kormovyh dobavok / A. I. Petenko, Ju. A. Lysenko // Veterinarija Kubani. – 2012. – № 4. – S. 24-26.

13. Sergeev V. N. Molochnaja promyshlennost' v uslovijah rynka / V. N. Sergeev // Molochnaja promyshlennost'. – 1996. – № 1. – S. 3-7.

14. Sorokina N. P. Bakterial'nye koncentraty / N. P. Sorokina // Syrodelle i maslodelie. – 2004. – № 3. – 16 s.

15. Sorokina N. P. Assortiment bakterial'nyh koncentratov «Jeksperimental'noj biofabriki» VNIIMS // Sb. materialov mezhdunarodnogo specializirovannogo nauchno-prakticheskogo seminaru «Bakterial'nye zakvaski i biologicheskie sredstva, primenjaemye v proizvodstve fermentirovannyh molochnyh produktov v Rossii». – Uglich, 2005. – с.76-79.