

Лиофильное высушивание культур молочнокислых микроорганизмов для приготовления бактериальных заквасок.

ХОРОЛЬСКИЙ В.В. и ЦВЕТКОВА Н.Н.
 Московский технологический институт мясной и молочной промышленности, СССР, г.Москва, 1981
 ТРЕНИНА Г.А. и КЛЮЧЕВА М.В.
 Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Производство сыровяленых колбас с применением бактериальных культур представляет большой практический интерес. Бактериальные закваски позволяют значительно улучшить качество колбасных изделий, упростить и сократить процесс изготовления, продлить сроки хранения готовой продукции. Поэтому разработка удобного и надежного метода хранения молочнокислых бактерий, используемых в производстве сыровяленых колбас в качестве бактериальных заквасок, представляет собой весьма важную в практическом отношении задачу.

Лиофилизация является весьма удобным для производственных целей способом сохранения жизнеспособности промышленных микроорганизмов. Однако различные микробные культуры не одинаково переносят суолимационное высушивание, и нет общих рекомендаций, которые были бы пригодны для всех микроорганизмов. Повреждение и гибель клеток в процессе лиофилизации возникает под действием многих факторов и их комбинаций.

Успех использования метода лиофилизации зависит от состояния культуры, подвергающейся суолимации, скорости замораживания, состава защитных сред, условия регидрации и многих других причин.

В работе были использованы культуры *Lactobacterium plantarum* (штамм П1, 22₂, 31, 32).

Для лиофилизации молочнокислых бактерий после окончания инкубации в каждую пробирку с культурой, выросшей на плотной питательной среде вносили по 2 мл. стерильной воды и с помощью бактериальной петли готовили суспензию микробных клеток. Полученную суспензию помещали в стерильные пробирки, куда добавляли равное количество "защитной" среды, необходимой для лиофильного высушивания клеток.

Культуры, выращенные на жидкой питательной среде, центрифугировали при 2500 об/мин. в течение 20 мин., затем сливали надосадочную жидкость и добавляли 0,5% раствор бикарбоната натрия, чтобы нейтрализовать молочную кислоту. Полученную суспензию вновь центрифугировали при том же режиме. Надосадочную жидкость удаляли и к осадку добавляли "защитную" среду в отношении (1:2).

В качестве протекторных сред при лиофилизации изучаемых культур были проведены: "БСС"-бычья сыворотка с 10% сахарозы; "СЖ"- 3% раствор желатина с 10% сахарозы; "См"-снятое коровье молоко с 10% сахарозы и "БССж"-сыворотка бычьей крови с 3% желатина и 10% сахарозы. Суспензии клеток, помещенную в соответствующую среду в объеме 0,2 мл. в стерильных условиях вносили в ампулы лиофильного высушивания.

Лиофилизацию культур проводили в суолимационной сушилке фирмы "Эдвардс" (модель Е-6) при осадочном давлении 0,07-0,1 мм.рт.ст. с предварительным замораживанием материала при -70°C в смеси сухого льда со спиртом ("с/з") или без предварительного замораживания с применением центрифугирования ("б/з").

Выживаемость культур, подвергшихся лиофилизации, проверяли непосредственно после лиофилизации и в процессе хранения путем определения в популяции количества клеток, способных к росту на плотной питательной среде соответствующего состава.

Сахаролитическую активность культур определяли на средах с глюкозой, сахарозой, лактозой, маннитом. Ферментативную активность контролировали через каждые 2 часа в течение 5 суток.

Проверку на солеустойчивость проводили путем посева бактерий на МПБ или МПА с 2-8% NaCl. Посевы помещали в термостат при 30°C и контролировали рост через каждые 24 часа в течение 3-х суток.

Кислотообразующую способность культур определяли путем изменения pH после культивирования клеток в жидкой среде накопления при 30°C в течение 24 часов.

Изучение антагонистических свойств производили на плотной питательной среде с помощью метода штрихов. В качестве тест-культур использовали штаммы: *Staphylococcus aureus* ЦММБ В-1009, *Escherichia coli* ЦММБ В-1, *Bacillus subtilis* ЦММБ В-339, *Proteus vulgaris* ЦММБ В-1667, *Streptomyces coelicolor* ЦММБ-6, *Penicillium sp.* ЦММБ -2. Суспензии клеток тест-культур высеивали в виде штрихов перпендикулярно к полосе 48-часовой культуры исследуемых молочнокислых бактерий, выращенных на плотной питательной среде в чашке петри. Затем посевы помещали в термостат и инкубировали при 37°C, производя наблюдения в течение 3-х суток.

С целью возможности использования лиофильно высушенных бактериальных культур для изготовления заквасок при производстве сыровяленых колбас, мы проводили лиофилизацию исследуемых нами бактерий и, после двух месяцев хранения их в лиофилизированном состоянии, определяли жизнеспособность хранящихся культур и наличие у них определенных свойств, характерных для бактерий, используемых при изготовлении заквасок: антагонистической активности, сахаролитической активности, устойчивости к высокому содержанию соли в среде и кислотообразующей активности.

Процесс лиофилизации состоит из высушивания материала из замороженного состояния под вакуумом. При этом свободная вода и вода, непрочно связанная с гидрофильными веществами клеток, подвергаются замораживанию и затем происходит сублимация льда, т.е. переход из твердого

состояния в газообразное, минуя жидкую фазу /I/. Опыты показывают, что одни микроорганизмы более чувствительны к лиофилизации, чем другие (2-5). В связи с этим для успешной лиофилизации культур в каждом конкретном случае необходима специальная разработка оптимальных условий предварительного выращивания клеток (6,7), состава суспензионных или "защитных" сред, которые помещают клетки для лиофилизации (5), режима суолимационного высушивания и других факторов на выживаемость культур при лиофилизации (1,2).

В таблице 1, представлены результаты определения выживаемости используемых нами бактериальных культур непосредственно после их лиофилизации. В этом случае культуры *Lbm.plantarum* выращивали на жидкой питательной среде, как это делают при изготовлении заквасок. В качестве суспензионной протекторной среды была использована среда "СЖ". Материал подвергали суолимационной сушке без предварительного замораживания.

Таблица 1. Table 1

Наименование бактерий и номер штамма Kind of bacteria and strain No.		Содержание жизнеспособных клеток в 1мл. суспензии Viable cells/ml of suspension		Выживаемость % Survival, %
		до лиофилизации before lyophiliz.	после лиофилизации after lyophiliz.	
<i>Lbm. plantarum</i> 2П		2,0 · 10 ¹⁰	1,9 · 10 ⁹	9,5
" " " 22 ₂		1,2 · 10 ⁹	8,3 · 10 ⁸	69,2
" " " 31		8,0 · 10 ⁸	3,1 · 10 ⁸	38,7
" " " 52		11,1 · 10 ⁹	3,8 · 10 ⁸	34,5

Из полученных данных выживаемость *L.plantarum* в указанных условиях колебалась в довольно широких пределах: от 9,5% у штамма 2П до 69,2% у штамма 22₂. Вероятно такие колебания связаны с индивидуальными особенностями штаммов. Высокая чувствительность к стрессовым условиям процесса лиофилизации у некоторых штаммов *L. plantarum*, выращенных на жидкой питательной среде, вызвала необходимость выяснения влияния условий предварительного выращивания лактобактерий на их выживаемость после суолимации.

Целью исследования влияния условий предварительного выращивания на резистентность клеток *L.plantarum* к неблагоприятным воздействиям процесса лиофилизации, выращивание каждого штамма проводили параллельно на жидкой и плотной питательных средах. В качестве протектора при лиофилизации выращенных культур использовали среду "Сж".

Полученные при этом результаты определения выживаемости представлены в таблице 2.

Таблица 2 Table 2

Наименование бактерий и номер штамма Kind of bacteria and strain No.		Среда выращивания Culture medium	Содержание жизнеспособных клеток в 1 мл. суспензии Viable cells/ml of suspension		Выживаемость % Survival, %
			до лиофилизации before lyophiliz.	после лиофилизации after lyophiliz.	
<i>L. plantarum</i> 2П	1	1	1,7 · 10 ⁹	3,7 · 10 ⁸	21,8
	2	2	2,0 · 10 ¹⁰	1,9 · 10 ⁹	9,5
<i>L. plantarum</i> 22 ₂	1	1	1,6 · 10 ⁹	1,2 · 10 ⁹	75,0
	2	2	1,2 · 10 ⁹	8,3 · 10 ⁸	69,2
<i>L. plantarum</i> 31	1	1	6,8 · 10 ⁸	6,6 · 10 ⁸	94,1
	2	2	8,0 · 10 ⁸	3,1 · 10 ⁸	38,7
<i>L. plantarum</i> 32	1	1	1,2 · 10 ⁹	9,1 · 10 ⁸	75,8
	2	2	1,1 · 10 ⁹	3,8 · 10 ⁸	34,5

1 - плотная среда; 2 - жидкая среда.

Данные таблицы 2 позволяют сделать вывод о том, что клетки *L.plantarum*, выращенные на плотной среде, более устойчивы к суолимационному высушиванию, чем клетки жидких культур. И в этом случае штаммовые различия проявляются весьма отчетливо. Наиболее чувствительным к лиофилизации оказался штамм 2П, выживаемость которого даже при выращивании его на жидкой питательной среде составляла 21,8% в то время как у других штаммов *L.plantarum* колебалась от 9,5% до 94,1%.

Целью разработки наиболее благоприятного для клеток молочнокислых бактерий режима лиофилизации было проведено изучение влияния состава протекторных сред на выживаемость исследуемых культур после суолимационного высушивания. В этих опытах были использованы два штамма *L.plantarum* 2П и 52, выращенных на жидкой питательной среде и оказавшихся в первых экспериментах более чувствительными к лиофилизации, чем другие штаммы того же вида (см.табл.1).

В таблице 3 приведены результаты влияния состава протекторных сред на выживаемость молочнокислых бактерий после лиофилизации.

Таблица 3. Table 3.

Наименование микроорганизмов и номер штамма Kind of organism and strain No.	Протекторная среда Protective medium	Содержание жизнеспособных клеток в 1мл. суспензии Viable cells/ml of suspension		Выживаемость % Survival, %
		до лиофилизации before lyophilization	после лиофилизации after lyophilization	
L. plantarum 2П	"СЖ"	$4,1 \cdot 10^9$	$3,5 \cdot 10^8$	8,8
	"СМ"	"—"	$4,2 \cdot 10^8$	10,2
	"БСС"	"—"	$1,4 \cdot 10^9$	34,1
	"БССЖ"	"—"	$1,5 \cdot 10^9$	31,7
L. plantarum 32	"СЖ"	$2,8 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$	39,3
	"СМ"	"—"	$1,1 \cdot 10^9$	39,5
	"БСС"	"—"	$1,9 \cdot 10^9$	67,9
	"БССЖ"	"—"	$2,0 \cdot 10^9$	71,4

Совершенно очевидно, что суспензионные среды, содержащие в своем составе сыворотку крови крупного рогатого скота ("БСС" и "БССЖ"), дают наилучший защитный эффект при лиофилизации указанных культур.

Известно, что существенное влияние на выживаемость бактерий после лиофилизации оказывает скорость замораживания материала при сублимационном высушивании (5). В нашей работе были проведены эксперименты по лиофилизации изучаемых культур молочнокислых бактерий с предварительным замораживанием материала при -70°C и без предварительного замораживания с применением центрифугирования для увеличения поверхности испарения при вакуумной сушке культур. Скорость замораживания материала в указанных условиях была различна. В качестве протектора в этих экспериментах была использована среда "БССЖ". Результаты, приведенные в таблице 4, позволяют судить, что клетки молочнокислых бактерий лучше переносят сублимацию после их предварительного замораживания при -70°C .

Таким образом, в результате проведения экспериментов был разработан режим лиофилизации молочнокислых бактерий, который позволит добиться высокой выживаемости культур после сублимационного высушивания. Клетки молочнокислых бактерий, выращенные на плотной питательной среде, помещали в протекторную среду "БССЖ" и полученную суспензию подвергали предварительному замораживанию при -70°C с последующим высушиванием в аппарате фирмы "Эдвардс".

Таблица 4. Table 4

№ п/п №	наименование микроорганизма и номер штамма Kind of organism and strain No.	Условия лиофилизации Lyophilization conditions	Содержание жизнеспособных клеток в 1мл. суспензии Viable cells/ml of suspension		Выживаемость % Survival, %
			до лиофилизации before lyophilization	после лиофилизации after lyophilization	
1.	L. plantarum 2П	"б/з"	$6,9 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	31,9
		"с/з"	"—"	$4,3 \cdot 10^9$	62,3
2.	L. plantarum 32	"б/з"	$2,4 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^9$	70,8
		"с/з"	"—"	$2,4 \cdot 10^9$	100,0

С целью возможности длительного хранения сублимированных таким образом бактерий, лиофильно высушенные культуры штаммов L. plantarum 2П и 32 были выделены из состояния анабиоза и проведена их выживаемость после 2-х и 12 месяцев хранения (таблица 5). Как видно из таблицы, клетки не теряют своей жизнеспособности при последующем хранении.

Выводы.

1. проведена лиофилизация различных штаммов L. plantarum. все изученные культуры оказались жизнеспособными и физиологически активными после двух месяцев хранения их в лиофильном состоянии.
2. разработаны оптимальные условия лиофилизации L. plantarum позволяющие получить высокую выживаемость культур непосредственно после сублимации и после года хранения в лиофильно высушенном виде.
3. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод лиофилизации для хранения микробных культур, используемых в качестве бактериальных заквасок при производстве сыровяленых колбас.

Таблица 5. Table 5

Выживаемость молочнокислых бактерий после длительного хранения в лиофильно высушенном виде.
Survival of lactic acid bacteria after long storage

Содержание жизнеспособных клеток в 1 мл. суспензии
Viable cells/ml of suspension

ДО ЛИОФИЛИЗАЦ. before lyophilization	ПОСЛЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ after lyophilization		ПОСЛЕ ХРАНЕНИЯ В ТЕЧЕНИЕ 2 И 12 МЕСЯЦЕВ after 2 and 12 month storage			
	КОЛ-ВО КЛЕТОК No. of cells	%	КОЛ-ВО КЛЕТОК No. of cells	% К ЧИСЛУ КЛЕТОК ВЫЖИВ- ШИХ ПОСЛЕ ЛИ- ОФИЛИЗАЦИИ % of survived after lyophi- lization	КОЛ-ВО КЛЕТОК No. of cells	% К ЧИСЛУ КЛЕ- ТОК, ВЫЖИВШИХ ПОСЛЕ ЛИОФИ- ЛИЗАЦИИ % of survived after lyophi- lization
1,3 · 10 ¹⁰	9,1 · 10 ⁹	70,0	9,1 · 10 ⁹	100,0	9,1 · 10 ⁹	100
3,6 · 10 ⁹	2,9 · 10 ⁹	80,3	2,8 · 10 ⁹	96,5	3,0 · 10 ⁹	100

Температура.

Rey L. 1960. Traite de lyophilisation. Paris.

Бланков Б., Клебанов Д. Применение лиофилизации в микробиологии. Медгиз. Москва, 1961г.

Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов 1967г. со.под ред. Красильникова.

Lepage S.P., Shelton Y.E. and Mitchell T.G. Mackenzie A.R. 1969. Culture collections and the preservation of bacteria. In "Methods in Microbiology", ed. J.K.Norris and D.W.Ribbons. 3A pp. 136-228. London and New York. Academic Press.

Orndorff G.R. and Mackenzie A.K. 1973. Function of the suspending medium during the freeze-drying preservation of Escherichia coli. Cryobiology. 10. pp. 475-487.

Nei T., Araki T. and Matsusaka T. 1969. Freezing injury to aerated and non-aerated cultures of Escherichia coli. In "Freezing and Drying of Microorganisms", ed. T.Nei. p.3. Tokyo University Press.

Smittle R.B., Oilliland S.E., Speck M.L. and Walter W.M., Jr. 1974. Relationship of cellular fatty acid composition to survival of Lactobacillus bulgaricus in liquid nitroge. Applied Microbiology 27, pp. 738-743.