

Сохранение жизнеспособности и свойств коллекционных культур молочнокислых бактерий при длительном хранении

Ирина Валентиновна Кучеренко, старший научный сотрудник, заведующая коллекцией

E-mail: i.kucherenko@fneps.ru

Елена Сергеевна Масежная, младший научный сотрудник

Анна Юрьевна Дуганова, младший научный сотрудник

E-mail: a.duganova@fneps.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Углич

В статье представлен анализ сохранения жизнеспособности коллекционных культур молочнокислых бактерий при длительном хранении при температуре 2–4 °С. Культуры консервировали методами вакуумной сушки без замораживания и лиофилизации. Установлена высокая выживаемость лактококков в течение от 3 до 54 лет хранения, остаточное количество жизнеспособных клеток составило от 0,98 до 43 млн. КОЕ в ампуле. Отмечено снижение кислотообразующей активности у 8,3 % лактококков из 3552 штаммов и потеря жизнеспособности у 30 штаммов, которые оживлялись в течение последних 25 лет для производства бактериальных заквасок. 12,9 % молочнокислых палочек не сохранили свою жизнеспособность после 62 лет хранения.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, лиофилизация, выживаемость, длительное хранение

Изготовление ферментированных молочных продуктов основано на использовании бактериальных заквасок, которые относятся к функционально необходимым компонентам и без которых невозможно производство соответствующего продукта переработки молока. Для производства коммерческих бактериальных заквасок используются культуры заквасочных микроорганизмов, что подразумевает наличие коллекций производственно-ценных культур.

Сбор и поддержание коллекций микроорганизмов являются одним из важных направлений практической деятельности изготовителей бактериальных заквасок. Основной задачей коллекционной деятельности в таких организациях является формирование коллекционных фондов штаммов с технологически значимыми свойствами и поддержание культур в жизнеспособном состоянии с сохранением их первоначальных биотехнологических свойств в течение максимально возможного времени. Для этого необходимо обеспечить содержание микроорганизмов в условиях, которые исключают утрату жизнеспособности и предотвращают мутационные изменения их свойств, что является сложной и трудоёмкой задачей.

Со времен Л. Пастера и Р. Коха и до настоящего времени в различных лабораториях и коллекциях широко используется метод субкультивирования, заключающийся в периодических пересевах (пассажах) культур на свежие питательные среды. Однако при таком хранении культур может происходить накопление генетических мутаций, изменение биологических свойств бактериальных клеток, загрязнение посторонней микрофлорой и даже их гибель. Кроме этого, требуется значительное пространство для хранения. Поэтому этот метод обычно используется для кратковременного поддержания в жизнедеятельном состоянии рабочих культур при определении их таксономического положения (идентификации) и изучении технологически важных свойств культур микроорганизмов при отборе и подборе их в состав заквасочной микрофлоры. Метод субкультивирования используется также при сохранении культур, которые не выдерживают других методов хранения [1].

Известно, что снижение температуры тормозит рост, размножение и жизнедеятельность микроорганизмов. При достижении уровня «биологического нуля» рост и размножение микроорганизмов

практически прекращается, но микробные клетки остаются жизнеспособными, при этом, продолжительность сохранения клетками жизнеспособности зависит от их индивидуальных особенностей, режимов перевода клеток из жизнедеятельного состояния в анабиоз и обратно, степени торможения процессов жизнеобеспечения микробных клеток. Уже на начальных этапах формирования и деятельности коллекции при хранении культур использовались низкие положительные температуры (обычно 4 ± 2 °С). Этот метод и сегодня используется во всех коллекциях для кратковременного сохранения культур микроорганизмов в жизнеспособном состоянии [2].

Проблема потери активности бактерий в результате постоянных пересевов возникала не только в коллекциях и в лабораториях, в которых изготавливали закваски на чистых культурах, но и на молочных предприятиях. В 1949 г. Министерство мясной и молочной промышленности СССР утвердило инструкцию по использованию холода при работе с чистыми культурами, разработанную ВНИМИ и согласованную с Министерством здравоохранения СССР. Согласно этой инструкции, рекомендовалось сохранять чистые культуры молочнокислых стрептококков не только при низких положительных температурах, но и в замороженном состоянии для сохранения коллекций в лабораториях, изготавливающих коммерческие закваски, и на молочных заводах, имеющих морозильные камеры (например, для закалки мороженого), для сохранения чистых культур и заквасок.

При сохранении значительных коллекционных фондов используются долгосрочные методы хранения культур. В современных коллекциях жизнеспособность микроорганизмов, стабильное сохранение их морфологических, физиолого-биохимических, технологических, генетических и других свойств, поддерживают с помощью различных способов консервации: распылительная, низкотемпературная вакуумная и сублимационная (лиофильная) сушки, криоконсервация [3]. Вопросам сохранности молочнокислых бактерий и бактериальных заквасок при различных способах консервации и хранения изучали многие исследователи [4, 5, 6], но эта проблема остаётся актуальной и по сей день, поскольку с использованием современных молекулярно-генетических методов исследований установлены факты накопления многочисленных мутаций в геномах бактерий в процессе длительного хранения [7].

В последние годы для хранения микроорганизмов в крупных коллекциях используют ультранизкие температуры (криоконсервация), которые достигаются в сосудах Дюара, рефрижераторах или специальных контейнерах с азотом. Криоконсервация и лиофилизация считаются наиболее ценными и надежными методами долгосрочного сохранения широкого спектра биологических ресурсов [7]. Преимущества метода криогенного хранения состоят в малой вероятности заражения культуры, хорошей сохраняемости их жизнеспособности и свойств. Трудности метода заключаются в том, что требуется специализированное дорогостоящее оборудование и постоянный контроль за его работой. Клетки лиофилизированных микроорганизмов длительное время сохраняются в жизнеспособном состоянии при температуре 4 °С, что значительно упрощает работу по поддержанию коллекционного фонда [8].

Метод лиофилизации заключается в высушивании клеток из замороженного состояния под вакуумом, минуя жидкую фазу. Первые опыты по лиофилизации вирусов и бактерий были проведены Шаккелем (1909 г.), Хаммером (1909–1914 гг.) и Свифтом (1921–1937 гг.) [1]. В настоящее время лиофилизация используется практически во всех коллекциях для длительного сохранения различных культур (десятилетия). Лиофильная сушка используется также при производстве сухих бактериальных заквасок для ферментированных пищевых продуктов [9].

При сублимации в процессе обезвоживания бактериальные клетки испытывают экологический стресс, такой как замораживание, сушка, длительное воздействие низкого содержания воды и регидратация. Выживание микроорганизмов во время этого процесса зависит от многих факторов, включая свойства внутренней устойчивости штаммов, начальную концентрацию микроорганизмов, условия роста, среду сушки и защитные средства, условия хранения и условия регидратации. При замораживании происходит повреждение клеток, которые обусловлены различными причинами, в том числе высокой концентрацией электролита или образованием внутриклеточного льда. В процессе хранения инактивация происходит главным образом из-за окисления липидов в клеточных мембранах [10]. Поэтому при лиофилизации для предотвращения гибели клеток используют защитные среды, которые содержат углеводы, белковые соединения и другие вещества. Углеводы из защитных сред

проникают внутрь клетки и повышают осмотическое давление, что препятствует образованию кристаллов льда и разрушению клетки. Белки в клетки не проникают, но способствуют более плотному прилеганию клеточной стенки к цитоплазме, а это имеет важное значение при размораживании [9]. Одной из широко используемых защитных сред служит обезжиренное молоко, содержащее дисахарид лактозу, казеины и сывороточные белки.

Сравнительно простым и недорогим способом хранения бактерий является их высушивание на полосках или дисках стерильной фильтровальной бумаги. Техника этого метода заключается в том, что стерильную бумагу пропитывают суспензией бактерий и высушивают на воздухе или под вакуумом. Однако при сушке на воздухе возможно загрязнение культур посторонней микрофлорой, поэтому предпочтительней осуществлять сушку в ампулах с использованием вакуума. При этом способе консервации отсутствуют повреждения бактериальных клеток, которые происходят в процессе замораживания-оттаивания микробной культуры, что обеспечивает довольно высокую выживаемость бактерий и сохранение их жизнеспособности при длительных сроках хранения. В качестве бумажного носителя клеток может использоваться как фильтровальная, так и водорастворимая бумага. Полоски или диски хранят в запечатанных пробирках или в запаянных ампулах. Хранение под вакуумом и при низких температурах увеличивает срок сохранения культур в жизнеспособном состоянии [11].

Целью данной работы является анализ сохранения жизнеспособности и производственных свойств коллекционных культур лактококков при длительном хранении в коллекции культур молочнокислых бактерий Экспериментальной биофабрики ВНИИМС. Коллекция начала формироваться с момента создания лаборатории заквасок при ВНИИМСе ещё в 1940 г. и длительность сохранения жизнеспособности производственно-ценных штаммов молочнокислых бактерий имеет большое значение не только для поддержания коллекции, но и для обеспечения выпуска отечественных бактериальных заквасок.

Для сохранения культур заквасочных микроорганизмов в коллекции используются два метода консервации: лиофилизация и вакуумная сушка на бумажном носителе в ампулах, которые после

сушки запаиваются под вакуумом. Хранение высушенных культур осуществляется в холодильной камере при температуре не выше 4 °С.

Процесс лиофилизации и хранения коллекционных культур лактококков включает следующие основные этапы:

- подготовка ампул и культур;
- замораживание подготовленных культур;
- лиофилизация культур;
- запаивание ампул с высушенными культурами;
- маркировка ампул;
- хранение сухих культур.

Для подготовки лактококков к консервации их культивируют на стерильном обезжиренном молоке при температуре (30 ± 1) °С в течение 16 ч (доза инокулята – 1 петля на 10 мл молока). Полученные молочные культуры контролируют по микроскопическому препарату и заливают с помощью пастеровской пипетки в стерильные ампулы по 0,5 мл или наносят по 2–3 капли на полоску стерильной фильтровальной бумаги, находящейся внутри ампулы. Защитные среды не используются, поскольку обезжиренное молоко само является такой средой.

Замораживание культур проводят в охлаждающей смеси льда с хлоридом натрия с температурой -18 – -19 °С в течение 30–40 мин. Процесс лиофильной сушки продолжается в течение 2–3 ч, далее производится досушка при комнатной температуре еще в течение 2–3 ч. Окончание процесса сушки оценивается визуально: высушенная культура должна иметь вид сухой таблетки белого или кремового цвета, отстающей от стенок ампулы, без наличия влажных пятен недосушенной биомассы. Сушка на бумажном носителе проводится при комнатной температуре в течение 2–3 ч при остаточном давлении в системе не выше 20 мм рт. ст. Окончание процесса определяется визуально: полоски бумаги с нанесенной культурой должны быть сухими.

Ампулы после сушки запаивают под вакуумом путем введения ампулы в месте перехвата в пламя газовой горелки. Края запаянной ампулы заливают расплавленным парафином. Запаянные ампулы проверяют на наличие вакуума. Высушенные культуры хранятся в холодильной камере при температуре не выше +4 °С.

Хранение культур в сублимированном состоянии организовано в коллекции в 1950 годы. До

начала 1961 года культуры сублимировали в пробирках, закрывали ватными пробками и заливали парафином (рис. 1а), а с 1961 года начали использовать стеклянные ампулы (рис. 1б). Вакуумная сушка в ампулах на бумажном носителе используется с 1998 года (рис. 1в).

По мере хранения высушенных штаммов они регулярно с определённой периодичностью оживляются для подбора в состав микрофлоры бактериальных заквасок и их производства. После оживления культур исследуются их кислотообразующая активность, органолептические свойства и микроскопический препарат. Кислотообразующую активность оценивают по времени образования сгустка при культивировании в стерильном обезжиренном молоке с дозой внесения инокулята 5 % от объёма молока при температуре (30 ± 1) °С в течение 10 ч. В состав микрофлоры заквасок включают штаммы, сквашивающие молоко за 6–7 часов, а культуры, сквашивающие молоко более 7 часов, не используются для изготовления заквасок.

Для оценки выживаемости культур лактококков в процессе длительного хранения было оживлено 25 штаммов, в том числе 10 штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и 15 штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, хранившихся от 3 до 24 лет на бумажном носителе (вакуумная сушка) и от 27 до 54 лет в лиофилизированном состоянии. Все исследованные штаммы сохранили жизнеспособность, имели хорошую органолептическую характеристику и микроскопическую картину.



Рисунок 1. Примеры хранения культур в сублимированном состоянии: а – культура, высушенная в пробирке 17.01.1961 г.; б – культура, высушенная сублимацией; в – культура, высушенная на бумажном носителе

Представленные в таблице результаты оценки кислотообразующей активности коллекционных штаммов лактококков, высушенных двумя методами, показали, что у двух штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (20 % от числа изученных) и у одного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (6,67 % от числа изученных), высушенных на бумажных носителях без замораживания, продолжительность сквашивания увеличилась до 8–9 часов. Снижение скорости кислотообразования выявлено также и у одного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и одного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, хранившихся в сублимированном состоянии. При этом срок хранения культур был достаточно длительным – 8, 19 и 24 года при вакуумной сушке и 29 и 45 лет при сублимационной сушке. Остаточное количество жизнеспособных клеток лиофилизированных культур составило от 0,98 до 43 млн. КОЕ в ампуле.

Для оценки длительности выживаемости лактобацилл были также оживлены 62 культуры мезофильных и термофильных молочнокислых палочек, в том числе 19 штаммов *Lactiplantibacillus plantarum*, 17 штаммов *Lacticaseibacillus casei*, 15 штаммов *Lactobacillus helveticus*, 8 штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и 3 штамма *Lactobacillus acidophilus*, сублимированные в 1961 году (период хранения 62 года). Восемь культур (12,9 %) лактобацилл не сохранили свою жизнеспособность после столь длительного хранения.

Кроме этого, нами были проанализированы данные о сохранности жизнеспособности и технологически важных свойств штаммов лактококков, использовавшихся в течение последних 25 лет для производства бактериальных концентратов. За этот период было оживлено и исследовано 3552 культуры лактококков, из которых 30 штаммов (0,87 %) полностью потеряли жизнеспособность, у 8,3 % культур наблюдалось снижение кислотообразующей активности, у 2,1 % штаммов отмечалось ухудшение органолептических показателей, которое выражалось в формировании слабого сгустка и невыраженного кисломолочного вкуса. Срок хранения культур составлял от 3 до 54 лет. Полученные данные согласуются с результатами исследований жизнеспособности лиофилизированных микроорганизмов различных видов после 50 лет хранения [12],

Таблица
Кислотообразующая активность лактококков после длительного хранения

№ штамма	Продолжительность хранения, лет		Кислотообразующая активность, ч		Количество клеток в лиофилизированных культурах, КОЕ/ампула
	вакуумная сушка	лиофилизация	вакуумная сушка	лиофилизация	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>					
476-8	15	28	6,0	6,0	$2,1 \times 10^7$
732-7	8	28	8,0	6,5	$8,4 \times 10^6$
686-6	9	35	7,0	7,0	$6,5 \times 10^6$
824-5	13	35	6,5	6,5	$1,1 \times 10^7$
Б-84	7	54	6,0	6,0	$9,8 \times 10^5$
707-5	3	31	6,0	6,0	$4,3 \times 10^7$
800-2с	8	36	6,0	6,0	$2,6 \times 10^7$
318-2-9	5	28	6,0	6,0	$6,1 \times 10^6$
581-7	19	29	9,0	8,5	$9,1 \times 10^6$
718-5	5	35	6,5	6,0	$8,7 \times 10^6$
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>					
975-8-5	17	38	7,0	6,5	$1,2 \times 10^7$
398-8	6	33	6,5	6,5	$2,3 \times 10^7$
517-1-8	19	29	6,0	6,0	$9,1 \times 10^6$
116-2	11	33	6,5	6,0	$1,4 \times 10^7$
504-3	10	32	6,5	6,0	$2,2 \times 10^7$
894-6	13	31	6,5	6,0	$3,1 \times 10^7$
942-3	15	31	6,5	6,0	$2,4 \times 10^7$
794-2	7	28	6,5	6,0	$3,5 \times 10^7$
359-5	13	27	6,0	7,0	$9,2 \times 10^6$
867-3	17	37	6,5	6,0	$1,1 \times 10^7$
358-1	24	45	8,5	8,0	$8,7 \times 10^6$
783-1	21	32	6,5	6,5	$1,8 \times 10^7$
215-1	15	34	6,0	7,0	$5,6 \times 10^6$
851-3	22	32	6,5	7,0	$9,3 \times 10^6$
33-1	22	30	6,0	6,0	$1,8 \times 10^7$

подтвердивших сохранность культур, для многих из которых авторами установлено остаточное количество клеток – 10^6 – 10^9 в ампуле.

Таким образом, полученные данные подтверждают довольно высокую выживаемость коллекционных культур лактококков при использовании для консервации вакуумной и лиофильной сушки. Однако утрата даже небольшого количе-

ства производственно-ценных культур, а также снижение кислотообразующей активности и ухудшение органолептических свойств сохранившихся жизнеспособность штаммов, на получение и содержание которых затрачены существенные ресурсы, свидетельствуют о необходимости совершенствования способов консервации, хранения и реактивации коллекционных культур с технологически значимыми свойствами. ■

Properties of Stock Cultures of Lactic Acid Bacteria during Long-Term Storage

Kucherenko I. V., Masegnaya E. S., Duganova A.Yu.

All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking – Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems, Uglich

The study featured the viability of lactic acid bacteria during long-term storage at 2–4 °C. The stock cultures were preserved by vacuum drying with no freezing or lyophilization. In general, the lactococci demonstrated a high survival rate after 3–54 years of storage: the residual viable cell count was 0.98–43 million CFU per ampoule. However, 8.3 % out of 3,552 lactococcal strains demonstrated a significant decrease in acid-inducing activity. Thirty strains, which had been used to produce bacterial starters for the past 25 year, lost their viability. Only 12.9 % of the lactobacilli that had been sublimated 62 years ago could not be revived.

Keywords: lactic acid bacteria, lyophilization, viability, long-term storage

Список литературы

1. **Аркадьева, З. А.** Хранение микроорганизмов / З. А. Аркадьева. – Промышленная микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – с. 149–167.
2. **Фатеева, Н. В.** Коллекции микроорганизмов и методы длительного хранения коллекционных культур / Н. В. Фатеева // Успехи микробиологии. 1983. Т. 18. С. 193–215.
3. **Gherna, R.** Culture preservation / R. Gherna. – In Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, ed. by Flickinger, M.C. – Hoboken, NJ, USA, 2010. – pp. 1–8.
4. **Скородумова, А. М.** Рациональная техника приготовления сухих культур молочнокислых бактерий / А. М. Скородумова // Молочная промышленность. 1936. № 11. С. 7–10.
5. **Банникова, Л. А.** Приготовление сухих культур молочнокислых бактерий при распылительной сушке / Л. А. Банникова // Труды ВНИМИ. 1953. Вып. 15. С. 39–56.
6. **Перфильев, Г. Д.** Изучение некоторых закономерностей перехода молочнокислых бактерий в анабиотическое состояние при замораживании и высушивании / Г. Д. Перфильев, А. В. Неберт // Труды ВНИИМС. 1991. Вып. 56. С. 51–56.
7. **Курилова, Е. А.** Накопление мутаций в геномах микроорганизмов в процессе длительного хранения и культивирования / А. Е. Курилова [и др.] // Бактериология. 2021. Т. 6. № 4. С. 84–93.
8. **Охупкина, В. Ю.** Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация. / В. Ю. Охупкина // Теоретическая и прикладная экология. 2009. №4. С. 21–32.
9. **Adams J.** The principles of freeze-drying / J. Adams // Methods Mol. Biol. 2007. V. 368. P. 15–38.
10. **Santivarangkna, C.** Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes / C. Santivarangkna [et al.] // Journal of Applied Microbiology. 2008. № 105. P. 1–13.
11. **Lapage, S. P.** Culture collection and the preservation of bacteria / S. P. Lapage [et al.] // Methods in microbiology. 1990. V. 3A. P. 135–228.
12. **Куплетская, М. Б.** Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения / М. Б. Куплетская, А. И. Нетрусов // Микробиология. 2011. Т. 80. № 6. С. 842–846.