УДК 663.128 : 579.841.92

UDC 663.128 : 579.841.92

DOI 10.30679/2219-5335-2022-1-73-233-242

DOI 10.30679/2219-5335-2022-1-73-233-242

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ
СОСТАВА
ПРОТЕКТИВНОЙ СРЕДЫ
И РЕЖИМА ВЫСУШИВАНИЯ
ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ
КОНСОРЦИУМА ДРОЖЖЕЙ
ZYGOSACCHAROMYCES
KOMBUCHAENSIS
И БАКТЕРИЙ
GLUCONACETOBACTER XYLINUS***

**DETERMINATION
OF THE COMPOSITION
OF THE PROTECTIVE MEDIUM
AND THE DRYING MODE
FOR STABILIZATION
OF THE CONSORTIUM
OF ZYGOSACCHAROMYCES
KOMBUCHAENSIS YEASTS
AND GLUCONACETOBACTER
XYLINUS BACTERIA***

Бабакина Мария Владимировна
аспирант, младший научный сотрудник
отдела хранения и комплексной
переработки сельскохозяйственного сырья
e-mail: wuhdz@mail.ru

Babakina Maria Vladimirovna
Postgraduate, Junior Research Associate
of Storage and Complex Processing
of Agricultural Raw Materials Department
e-mail: wuhdz@mail.ru

Першакова Татьяна Викторовна
д-р техн. наук, доцент
ведущий научный сотрудник
отдела хранения и комплексной
переработки сельскохозяйственного сырья
e-mail: 7999997@inbox.ru

Pershakova Tatyana Viktorovna
Dr. Sci. Tech., Docent
Leading Researcher
of Storage and Complex Processing
of Agricultural Raw Materials Department
e-mail: 7999997@inbox.ru

Самойленко Мария Владимировна
младший научный сотрудник
отдела хранения и комплексной
переработки сельскохозяйственного сырья
e-mail: marimanro13@yandex.ru

Samoylenko Maria Vladimirovna
Junior Research Associate
of Storage and Complex Processing
of Agricultural Raw Materials Department
e-mail: marimanro13@yandex.ru

*Краснодарский научно-исследовательский
институт хранения и переработки
сельскохозяйственной продукции –
филиал Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

*Krasnodar Research
Institute of Agricultural
Product Storage and Processing –
Branch of Federal State
Budgetary Scientific Institution
«North-Caucasus Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia*

* Инновационный проект выполнен при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках Конкурса научно-инновационных проектов, ориентированных на коммерциализацию № НИП 20.1/9.

* The innovative project was carried out with the financial support of the Kuban Science Foundation within the framework of the Competition of Scientific and Innovative Projects, oriented to commercialization № NIP 20.1/9.

При разработке новых биотехнологических решений для агропромышленного комплекса, одной из ключевых проблем является сохранение жизнеспособности микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ. Основным методом стабилизации микроорганизмов является высушивание. В процессе высушивания клетки подвергаются действию повреждающих стрессовых факторов, снижающих жизнеспособность. Протективные среды защищают клетки от факторов стресса. Микроорганизмы, относящиеся к неустойчивым видам, при высушивании без использования протективных сред подвержены значительным изменениям, сопровождающимся не только утратой жизнеспособности, но и разрушением их клеточной структуры. В связи с этим в процессе исследования был подобран оптимальный режим высушивания, предусматривающий интенсивный влагоотъем в самом начале сушки и прогрев до температуры не выше +32-35 °C на протяжении всего времени сушки. Следует отметить, что весь процесс сушки должен занимать не более 30 минут, поскольку при высушивании микроорганизмов по второму режиму с длительностью сушки 37 минут, количество мертвых клеток было несколько выше, чем в первом режиме. Так же в процессе исследования подобрана протективная среда, состоящая из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы, которая показала наилучшие результаты в качестве защиты клеток исследуемого консорциума от повреждающего фактора высушивания и последующей регидратации. Так же, при использовании данной протективной среды влажность исследуемого консорциума была наименьшей среди выбранных вариантов высушивания.

Ключевые слова: БИОТЕХНОЛОГИИ, ПРОТЕКТИВНАЯ СРЕДА, ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, РЕЖИМЫ ВЫСУШИВАНИЯ

When developing new biotechnological solutions for the agro-industrial complex, one of the key problems is the preservation of the viability of microorganisms – producers of biologically active substances. Drying is the main method for stabilizing microorganisms. During the drying process, cells are exposed to damaging stress factors that reduce their viability. Protective environments protect cells from stressors. Microorganisms belonging to unstable species, when dried without the use of protective media, are subject to significant changes, accompanied not only by the loss of viability, but also by the destruction of their cellular structure. In this regard, in the course of the study, the optimal drying mode was selected, which provides for intensive moisture removal at the very beginning of drying and warming up to a temperature not higher than + 32-35 °C throughout the entire drying time. It should be noted that the entire drying process should take no more than 30 minutes, since when drying microorganisms by the second mode with a drying duration of 37 minutes, the number of dead cells was slightly higher than with drying by the first mode. Also, during the study, a protective environment was selected, consisting of 1 % gelatin, 5 % sodium glutamate and 5 % sucrose, which showed the best results as protection of the cells of the consortium under study from the damaging drying factor and subsequent rehydration. Also, when using this protective environment, the moisture content of the consortium under study was the lowest among the selected drying options.

Key words: BIOTECHNOLOGIES, PROTECTIVE MEDIUM, STORAGE OF MICROORGANISMS, DRYING MODES

Введение. Одной из ключевых проблем, которую приходится преодолевать при разработке новых биотехнологических решений для агропромышленного комплекса, является сохранение жизнеспособности микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ. Высушивание – основной метод стабилизации и консервации микроорганизмов. В процессе высушивания клетки подвергаются действию повреждающих стрессовых факторов – осмотический стресс, изменения pH растворов, дегидратация вызывают повреждения клеточных структур и молекул. Окислительные реакции, протекающие в клетках, изменяют состав и структуру липидов, белков, нуклеиновых кислот и, как следствие, снижают количество живых клеток при хранении [1-4].

На жизнеспособность микроорганизмов после высушивания в значительной степени влияет состав защитной среды, применяемой для стабилизации клеток. Использование защитных сред, содержащих углеводы, аминокислоты, восстановленное молоко, желатин и другие компоненты снижает вероятность повреждений клеточных компонентов, увеличивает срок хранения микроорганизмов. Протективные среды должны защищать клетки от повреждений при замораживании, хранении, дегидратации, быть легко высушиваемыми, хорошо растворяться при регидратации и не обладать токсичностью [5].

В процессе высушивания необходимо сохранить живые микробные клетки с ненарушенным строением и высокой ферментативной активностью. Поэтому высушивание микроорганизмов должно протекать при сравнительно мягком температурном режиме с небольшой продолжительностью, чтобы исключить негативные протеолитические процессы в клетках [6-10].

Представляет интерес исследование влияния режимов высушивания и состава протективных сред на сохранность и стабилизацию процессов жизнедеятельности микроорганизмов для выбора наиболее оптимальных.

В связи с этим, цель исследования – выбор режима высушивания и оптимального состава протективной среды для стабилизации консорциума дрожжей *Zygosaccharomyces kombuchaensis* и бактерий *Gluconacetobacter xylinus* используемых в дальнейшем для переработки растительного сырья.

Объекты и методы исследований. Объектами исследования являлись клетки консорциума дрожжей *Zygosaccharomyces kombuchaensis* и бактерий *Gluconacetobacter xylinus*.

Микробиологические исследования проводили в соответствии с ГОСТ ISO 7218-2015, ГОСТ 31904-2012, ГОСТ 10444.12-2013, ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ 26669-85, ГОСТ 26670-91 [11-16] и по авторским методикам, разработанным в институте.

Как правило, для высушивания и заморозки используют многокомпонентные составы протективных сред, включающие вещества с разным механизмом защитного действия. Различные соотношения и комбинации этих соединений обеспечивают защитные свойства протективных составов, используемых в исследованиях и рекомендуемых для консервации микроорганизмов.

Для исследования выживаемости исследуемых микроорганизмов, нами были выбраны три варианта протективных сред:

- 1 вариант – 1 % желатина + 10 % сахарозы;
- 2 вариант – обезжиренное молоко 20 % + 7,5 % глюкозы;
- 3 вариант – 1 % желатина + 5 % глутамата натрия + 5 % сахарозы.

Данные составы протективных сред выбраны исходя из способности подобранных веществ сохранять твердое аморфное состояние при высушивании и остекловываться при замораживании. Критерием для определения сохранности живых клеток являлся подсчет колоний микроорганизмов, выросших после предварительных разведений на питательных средах. Процент выживаемости микроорганизмов определяли по отношению чис-

ла сохранившихся клеток к первоначальному числу (100 %) [22]. Концентрация клеток *Zygosaccharomyces kombuchaensis* и *Gluconacetobacter xylinus* до высушивания составляла 5×10^{12} КОЕ/г.

Для проведения исследований и исходя из изученной литературной информации, были выбраны два режима высушивания [17-21].

Первый режим высушивания был направлен на более интенсивную теплообработку исследуемых микроорганизмов на начальном этапе сушки. При этом микроорганизмы прогревались до температуры не выше +35 °С (табл. 1).

Таблица 1 – Параметры высушивания (1 режим)

Этап сушки	Время высушивания, мин	Заданная температура, °С
1	0-4	50
2	4-8	46
3	8-12	40
4	12-20	36
5	20-35	32

Второй режим был выбран как более щадящий и предусматривал более длительную обработку высушиваемого материала при пониженной температуре. Клетки исследуемого микробного консорциума при этом прогревались до температуры не более +32-33 °С (табл. 2).

Таблица 2 – Параметры высушивания (2 режим)

Этап сушки	Время высушивания, мин	Заданная температура, °С
1	0-4	48
2	4-8	46
3	8-12	42
4	12-15	38
5	15-20	36
6	20-25	33
7	25-30	30
8	30-37	32

Обсуждение результатов. Результаты высушивания исследуемого консорциума по первому режиму представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влажность и количество выживших клеток при первом режиме высушивания исследуемого консорциума

Защитная среда	Влажность, %	Выжившие клетки, %
1 вариант 1 % желатина + 10 % сахарозы	7,46	23
2 вариант обезжиренное молоко 20 % + 7,5 % глюкозы	7,31	28
3 вариант 1 % желатина + 5 % глутамата натрия + 5 % сахарозы	7,30	31

Исходя из представленных данных, после высушивания по первому режиму, при использовании 1 варианта протективной среды, влажность исследуемого консорциума составляла 7,46 %, выживших клеток – 23 %; при использовании 2 варианта – 7,31 % и 28 %, соответственно. При использовании 3 варианта протективной среды влажность исследуемого консорциума составила 7,30 %, а процент выживших клеток составил 31 %. Таким образом, при первом режиме высушивания минимальная влажность и максимальный процент выживших клеток достигаются при использовании протективной среды, состоящей из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы.

Результаты высушивания консорциума по второму режиму представлены в таблице 4. Исходя из представленных данных, при использовании протективной среды из 1 % желатина и 10 % сахарозы, после высушивания в течение 27 минут влажность исследуемого консорциума была 7,54 %, выживших клеток – 12 %. При использовании протективной среды, состоящей из 20 % обезжиренного молока и 7,5 % глюкозы, после высушивания в течение 27 минут влажность исследуемого консорциума составила 7,50 %, выживших клеток – 14 %. При использовании протективной среды, состоящей из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы, влажность исследуемого консорциума была 7,46 %, выживших клеток – 24 %.

Таблица 4 – Влажность и количество выживших клеток при втором режиме высушивания исследуемого консорциума

Варианты защитных сред	Влажность, %	Выжившие клетки, %
1 вариант 1 % желатина + 10 % сахарозы	7,54	12
2 вариант обезжиренное молоко 20 % + 7,5 % глюкозы	7,50	14
3 вариант 1 % желатина + 5 % глутамата натрия + 5 % сахарозы	7,46	24

После высушивания по второму режиму, при использовании 1 варианта протективной среды, влажность исследуемого консорциума составляла 7,46 %, выживших клеток – 12 %; при использовании 2 варианта – 7,50 %, и 14 %, соответственно. При использовании 3 варианта протективной среды влажность исследуемого консорциума составила 7,46 %, а процент выживших клеток составил 7,46 %. Таким образом, при втором режиме высушивания минимальная влажность и максимальный процент выживших клеток достигаются при использовании протективной среды состоящей из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы.

Выводы. Как свидетельствуют полученные данные, процессы высушивания переносятся консорциумом тяжело, количество мертвых клеток составляет 69-88 %. Оптимальным является первый режим высушивания, предусматривающий интенсивный влагосъем в самом начале сушки и прогрев до температуры не выше +32-35 °C на протяжении всего времени сушки. Следует также отметить, что весь процесс сушки должен занимать не более 30 минут, поскольку при высушивании микроорганизмов по режиму 2, длительностью сушки 37 минут, количество мертвых клеток было несколько выше, чем в первом режиме.

Протективная среда, состоящая из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы, показала наилучшие результаты в качестве защиты клеток исследуемого консорциума от повреждающего фактора высушивания.

ния и последующей регидратации. Данная протективная среда увеличивает выживаемость в среднем на 4-13 % при высушивании как по первому, так и по второму варианту, что доказывает целесообразность ее дальнейшего применения. Сахароза, входящая в состав подобранной нами протективной среды, проникая в клетку, создает большое осмотическое давление, растворяет метаболиты и препятствует разрыву клеточной оболочки во время высушивания. Желатин создает осмотическое давление вне клетки и заставляет клеточную оболочку плотнее прилегать к плазме при регидратации клеток. Защитное действие глутамата натрия связано с его антиоксидантной активностью, способностью защищать клетки от свободно-радикального окисления при хранении.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. Киев, 1994. 433 с.
2. Богатырева М.А. Депонирование клеточных культур микро- и макроорганизмов: основные проблемы и условия. М., 2016. С. 49-55.
3. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. №. 3. С. 5-12.
4. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М., 2010. 464 с.
5. Adams G. The Principles of Freeze-Drying // Methods Mol. Biol. – Vol. 368. – 2007. – pp. 15-38.
6. Харитонов И., Просеков А.Ю., Шрамко М.И. Изучение качественных характеристик концентратов лактобактерий в процессе криоамораживания и сублимационной сушки // Вестник Северо-Кавказского федерального университета. 2015. № 2(47). С. 87-90.
7. Вакуумная сушка бактериальных концентратов и заквасок молочных бактерий / Н.Э. Каухчешвили [и др.] // Молочная промышленность. 2011. № 5. С. 30-31.
8. Бородулин Д.М., Невская Е.В., Непомнящая Т.И. Определение оптимального вида сушки закваски для производства хлебобулочных изделий // Явления переноса в процессах и аппаратах химических и пищевых производств: материалы II международной научно-практической конференции (Воронеж, 16-17 ноября 2016 г.). Воронеж, 2016. С. 419-425.
9. Prosekov A. Yu. Food security: The challenge of the present. – Geoforum. – Vol. 91. – 2018. – P. 73-77.
10. Peiren J., Helleinans A., De Vos P. Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections // Applied Microbiology and Biotechnology. – Vol. 100 (14). – 2016. – pp. 6239-6249.
11. ГОСТ ISO 7218-2015. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям. Введ. 01.07.2016. М.: Стандартинформ, 2016. 76 с.

12. ГОСТ 31904-2012. Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний. Введ. 01.07.2013. М.: Стандартинформ, 2014. 8 с.
13. ГОСТ 10444.12-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов. Введ. 01.07.2015. М.: Стандартинформ, 2014. – 12 с.
14. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Введ. 01.01.1996. М.: Стандартинформ, 2010. 7 с.
15. ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. Введ. 01.07.1986. М.: Изд-во стандартов, 1986. 9 с.
16. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. Введ. 01.01.93. М.: Издательство стандартов, 1992. 8 с.
17. Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes // J. Microbiol. Methods. – Vol. 58(1). – 2004. – pp. 31-38.
18. Zhan Y., Xu Q., Yang M.-M., Yang H.-T., Liu H.-X., Wang Y.-P., Guo J.-H. Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40 // Letters in Applied Microbiology. – Vol. 54(1). – 2011. – pp. 10-17.
19. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying // Journal of Applied Microbiology. – Vol. 99(2). – 2005. – pp. 333-338.
20. Богатырева М.А. Депонирование клеточных культур микро- и макроорганизмов: основные проблемы и условия. М., 2016. С. 49-55.
21. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Гальченко В.Ф. Многолетнее хранение коллекционных культур актинобактерий // Микробиология. 2012. № 81. С. 682-690.
22. Gamboa-Gomez C.I., Simental-Mendia L.E., Gonzalez-Laredo R.F., Alcantar-Orozco E.J., Monserrat-Juarez V.H., et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of anti-hyperglycemic and antioxidant effects of Oak leaves (*Quercus convallata* and *Quercus arizonica*) infusions and fermented beverages // Food Research International. – Vol. 102. – 2017. – pp. 690-699.

References

1. Belous A.M., Grishchenko V.I. Kriobiologiya. Kiev, 1994. 433 s.
2. Bogatyreva M.A. Deponirovanie kletochnyh kul'tur mikro- i makroorganizmov: osnovnye problemy i usloviya. – M., 2016. – S. 49-55.
3. Gracheva I.V., Osin A.V. Mekhanizmy povrezhdenij bakterij pri liofilizacii i protektivnoe dejstvie zashchitnyh sred // Problemy osobo opasnyh infekcij. 2016. №. 3. S. 5-12.
4. Gusev M.V., Mineeva L.A. Mikrobiologiya. M., 2010. 464 s.
5. Adams G. The Principles of Freeze-Drying // Methods Mol. Biol. – Vol. 368. – 2007. – pp. 15-38.
6. Haritonova I., Prosekov A.Yu., Shramko M.I. Izuchenie kachestvennyh harakteristik koncentratov laktobakterij v processe krioamorazhivaniya i sublimacionnoj sushki // Vestnik Severo-Kavkazskogo federal'nogo universiteta. 2015. № 2(47). S. 87-90.
7. Vakuumnaya sushka bakterial'nyh koncentratov i zakvasok molochnyh bakterij / N.E. Kauhcheshvili [i dr.] // Molochnaya promyshlennost'. 2011. № 5. S. 30-31.

8. Borodulin D.M, Nevskaya E.V., Nepomnyashchaya T.I. Opredelenie optimal'nogo vida sushki zakvaski dlya proizvodstva hlebobulochnyh izdelij // Yavleniya perenosa v processah i apparatah himicheskikh i pishchevyh proizvodstv: materialy II mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii (Voronezh, 16-17 noyabrya 2016 g.). Voronezh, 2016. S. 419-425.
9. Prosekov A.Yu. Food security: The challenge of the present. – Geoforum. – Vol. 91. – 2018. – P. 73-77.
10. Peiren J., Helleinans A., De Vos P. Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections // Applied Microbiology and Biotechnology. – Vol. 100 (14). – 2016. – pp. 6239-6249.
11. GOST ISO 7218-2015. Mikrobiologiya pishchevyh produktov i kormov dlya zhi-votnyh. Obshchie trebovaniya i rekomendacii po mikrobiologicheskim issledovaniyam. Vved. 01.07.2016. M.: Standartinform, 2016. 76 s.
12. GOST 31904-2012. Produkty pishchevye. Metody otbora prob dlya mikrobiologicheskikh ispytaniy. Vved. 01.07.2013. M.: Standartinform, 2014. 8 s.
13. GOST 10444.12-2013. Mikrobiologiya pishchevyh produktov i kormov dlya zhi-votnyh. Metody vyyavleniya i podscheta kolichestva drozhzhej i plesnevyyh gribov. Vved. 01.07.2015. M.: Standartinform, 2014. – 12 s.
14. GOST 10444.15-94. Produkty pishchevye. Metody opredeleniya kolichestva me-zofil'nyh aerobnyh i fakul'tativno-anaerobnyh mikroorganizmov. Vved. 01.01.1996. M.: Standartinform, 2010. 7 s.
15. GOST 26669-85. Produkty pishchevye i vkusovye. Podgotovka prob dlya mikrobiologicheskikh analizov. Vved. 01.07.1986. M.: Izd-vo standartov, 1986. 9 s.
16. GOST 26670-91. Produkty pishchevye. Metody kul'tivirovaniya mikroorga-nizmov. Vved. 01.01.93. M.: Izdatel'stvo standartov, 1992. 8 s.
17. Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D. Glycine betaine as a cryo-protectant for prokaryotes // J. Microbiol. Methods. – Vol. 58(1). – 2004. – pp. 31-38.
18. Zhan Y., Xu Q., Yang M.-M., Yang H.-T., Liu H.-X., Wang Y.-P., Guo J.-H. Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40 // Letters in Applied Microbiology. – Vol. 54(1). – 2011. – pp. 10-17.
19. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying // Journal of Applied Microbiology. – Vol. 99(2). – 2005. – pp. 333-338.
20. Bogatyreva M.A. Deponirovanie kletochnyh kul'tur mikro- i makroorganizmov: osnovnye problemy i usloviya. M., 2016. S. 49-55.
21. Filippova S.N., Surgucheva H.A., Gal'chenko V.F. Mnogoletnee hranenie kollekcionnyh kul'tur aktinobakterij // Mikrobiologiya. 2012. № 81. S. 682-690.
22. Gamboa-Gomez C.I., Simental-Mendia L.E., Gonzalez-Laredo R.F., Alcantar-Orozco E.J., Monserrat-Juarez V.H., et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of anti-hyperglycemic and antioxidant effects of Oak leaves (*Quercus convallata* and *Quercus arizonica*) infusions and fermented beverages // Food Research International. – Vol. 102. – 2017. – pp. 690-699.