

УДК 579.66; 579.67

05.20.01 – Технологии и средства механизации сельского хозяйства (технические науки)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ СТАБИЛИЗАЦИИ СИМБИОТИЧЕСКОГО КОНСОРЦИУМА, ПРИМЕНЯЕМОГО ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Самойленко Мария Владимировна
м.н.с
РИНЦ SPIN-код: 2690-8028
e-mail: marimanro13@yandex.ru

Бабакина Мария Владимировна
м.н.с.
РИНЦ SPIN-код: 2580-9961,
ScopusID: 57201875715,
e-mail: wuhdz@mail.ru

Свердличенко Анастасия Валерьевна
к.т.н., с.н.с
РИНЦ SPIN-код: 6547-8670
e-mail: a.v.chernenko@list.ru

Золотавина Мария Леонидовна
кандидат биологических наук, доцент
РИНЦ SPIN-код: 6349-3077,
e-mail: zolitavina_m@mail.ru
«Краснодарский научно-исследовательский институт хранения и переработки сельскохозяйственной продукции» - филиал ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия", Россия, 350072, г. Краснодар, ул. Тополиная аллея, 2

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Россия, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149

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. Проективные среды защищают клетки от факторов стресса. В связи с этим в процессе исследования была подобрана протективная среда, обеспечивающая минимальный процент гибели клеток состоящая из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы в качестве защиты клеток исследуемого консорциума, микроорганизмов

UDC 579.66; 579.67

05.20.01 - Technologies and means of mechanization of agriculture (technical sciences)

DETERMINATION OF OPTIMAL PARAMETERS OF STABILIZATION OF SYMBIOTIC CONSORTIUM USED FOR FRUIT RAW MATERIALS PROCESSING

Samoylenko Maria Vladimirovna
junior researcher
RSCI SPIN-code: 2690-8028
e-mail: marimanro13@yandex.ru

Babakina Maria Vladimirovna
junior researcher
RSCI SPIN-code: 2580-9961,
Scopus ID: 57201875715,
e-mail: wuhdz@mail.ru

Sverdlichenko Anastasia Valerievna
candidate of technical sciences
RSCI SPIN-code: 6547-8670
e-mail: wuhdz@mail.ru

Zolotavina Maria Leonidovna
candidate of biological sciences
RSCI SPIN-code: 6349-3077
e-mail: zolitavina_m@mail.ru
“Krasnodar Research Institute of Agricultural Products Storage and Processing” – branch of FSBSO “North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture & Viniculture”, Russia, 350072, Krasnodar, st.Topolinayaalleya, 2

FSBEI HE «Kuban State University», Russia, 350040, Krasnodar, st. Stavropolskaya, 149

The article discusses modern concepts of storage of microorganisms using protective media. Drying is the main method of bacterial conservation in culture collections and biological resource centers. During the drying process, cells are exposed to damaging stress factors, so their viability is unstable. In this problem of the preservation of living forms, the composition of the protective environment with which cells are mixed before conservation helps. Protective environments must protect cells from stressors. We have selected the optimal mode, which provides for intensive moisture removal at the very beginning of drying, while at the end of drying the microorganisms are warmed up to a temperature not higher than + 32-35 °C. A protective medium was also selected, consisting of 1 % gelatin, 5 % monosodium glutamate and 5 % sucrose, which showed the best results in protecting the cells of the

Zygosaccharomyces kombuchaensis и *Gluconacetobacter xylinus*. В процессе исследования подобраны оптимальный режим, сушки, предусматривающий интенсивный влагосъем в самом начале сушки, прогрев микроорганизмов до температуры не выше +32-35 °С. Инновационный проект выполнен при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках Конкурса научно-инновационных проектов, ориентированных на коммерциализацию № НИП 20.1/9

Ключевые слова: BIOTECHNOLOGIES, PROTECTIVE ENVIRONMENTS, STORAGE OF MICROORGANISMS, DRYING MODES, COMMERCIALIZATION

consortium under study, microorganisms *Zygosaccharomyces kombuchaensis* and *Gluconacetobacter xylinus*, since the percentage of cell death when using it was lower. The innovation project was carried out with the financial support of the Kuban Science Foundation in the framework of the Commercializable scientific and innovation projects competition № НИП20.1/9

Keywords: PROTECTIVE ENVIRONMENTS FOR MICROORGANISMS, STORAGE OF MICROORGANISMS, DRYING MODES

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-173-014>

При разработке новых биотехнологических решений для агропромышленного комплекса, одной из ключевых проблем, которую приходится решать, является сохранение жизнеспособности микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ. Основным методом стабилизации микроорганизмов является высушивание. При этом процессе клетки подвергаются действию стрессовых факторов: изменения рН растворов, осмотический стресс, дегидратация – вызывают повреждения клеточных структур и молекул. Окислительные реакции, протекающие в препаратах сухих клеток, изменяют состав и структуру липидов, белков, нуклеиновых кислот и, как следствие, снижают количество живых клеток при хранении [1].

Одним из главных факторов, влияющим на жизнеспособность микроорганизмов после высушивания, является состав защитной среды, с которой смешивают клетки перед высушиванием.

Эффект стабилизации достигается комплексом свойств, используемых компонентов защитной среды. Сахароза, проникая в клетку, создает высокое осмотическое давление и препятствует разрыву клеточной оболочки во время высушивания, стабилизирует структуру белков и понижает температуры фазовых переходов мембранных липидов, а так же,

<http://ej.kubagro.ru/2021/09/pdf/14.pdf>

образует водородные связи с полярно-заряженными группами белков, стабилизируя их структуру в отсутствие влаги [5]. Желатин не проникает внутрь клетки, но создает осмотическое давление вне клетки и заставляет клеточную оболочку плотнее прилегать к плазме при регидратации клеток [4]. Защитное действие глутамата натрия связывают с его антиоксидантной активностью, способностью защищать клетки от свободно-радикального окисления при хранении.

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

Протективные среды должны защищать клетки от повреждений при замораживании, дегидратации, хранении, быть легко высушиваемыми, хорошо растворяться при регидратации, не обладать токсичностью [3, 5].

Критерием в различных методах, для определения сохранности живых клеток, является подсчет колоний микроорганизмов, выросших после предварительных разведений на питательных средах. Процент выживаемости микроорганизмов определяют по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу за 100 % [1].

Использование защитных сред, содержащих углеводы, аминокислоты, восстановленное молоко, желатин и другие компоненты снижает вероятность повреждений клеточных компонентов, увеличивает срок хранения микроорганизмов. Подбор защитных сред и режимы высушивания проводят эмпирически. [2, 5].

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

Концентрация клеток *Zygosaccharomyces kombuchaensis* и *Gluconacetobacter xylinus* до высушивания составляла 5×10^{12} КОЕ/г.

Для исследования выживаемости исследуемых микроорганизмов, нами были подобраны два режима сушки и три варианта протективных сред.

Для протективных сред использовались следующие составы:

- 1 % желатина + 10 % сахарозы;
- обезжиренное молоко + 7,5 % глюкозы;
- 1 % желатина + 5 % глутамата натрия + 5 % сахарозы.

Первый режим сушки исследуемого консорциума был подобран так, чтобы произошла более интенсивная теплообработка микроорганизмов на начальном этапе сушки, однако микроорганизмы при этом прогревались до температуры не выше +35 °С (таблица 1).

Таблица 1 – Первый режим высушивания исследуемого консорциума дрожжей и бактерий

| Этап сушки | Время высушивания, мин | Заданная температура, °С |
|------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | 0-7 | 56 |
| 2 | 7-12 | 48 |
| 3 | 12-17 | 42 |
| 4 | 17-22 | 38 |
| 5 | 22-27 | 36 |

Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влажность и количество мертвых клеток при первом режиме высушивания исследуемого консорциума

| Защитная среда | Влажность, % | Мертвые клетки, % |
|--|--------------|-------------------|
| 1 % желатина + 10 % сахарозы | 7,62 | 85 |
| Обезжиренное молоко + 7,5 % глюкозы | 7,60 | 80 |
| 1 % желатина + 5 % глутамата натрия + 5 % сахарозы | 7,49 | 74 |

Исходя из представленных данных, при первом режиме высушивания протективная среда, состоящая из 1 % желатина, 5 %

глутамата натрия и 5 % сахарозы, показала наилучшие результаты в сохранении живых клеток исследуемого консорциума, так как процент гибели клеток при ее использовании был ниже, чем при использовании протективной среды из 1 % желатина и 10 % сахарозы на 12 %, и ниже, чем при использовании протективной среды из обезжиренного молока и 7,5% глюкозы – на 7,5 %. Так же, при использовании данной протективной среды, влажность исследуемого консорциума была наименьшей.

Второй режим направлен на прогрев микроорганизмов в начале сушки до температуры +39 °С, в результате чего происходит интенсивный влагосъем, а затем идет высушивание в более щадящем режиме. По окончании сушки высушиваемые микроорганизмы являются наиболее чувствительными к перегреву, поэтому температура их нагрева не превышает +32 °С (таблица 3).

Таблица 3 – Параметры высушивания (2 режим)

| Этап сушки | Время высушивания, мин | Заданная температура, °С |
|------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | 0-5 | 50 |
| 2 | 5-18 | 48 |
| 3 | 8-12 | 40 |
| 4 | 12-20 | 36 |
| 5 | 20-30 | 32 |

Результаты исследования представлены в таблице 4.

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

| Защитная среда | Влажность, % | Мертвые клетки, % |
|--|--------------|-------------------|
| 1 % желатина + 10 % сахарозы | 7,58 | 75 |
| Обезжиренное молоко + 7,5 % глюкозы | 7,42 | 71 |
| 1 % желатина + 5 % глутамата натрия + 5 % сахарозы | 7,32 | 65 |

Исходя из представленных данных протективная среда, состоящая из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы, показала наилучшие результаты в сохранении живых клеток исследуемого консорциума, так как процент гибели клеток при ее использовании был ниже, чем при использовании протективной среды из 1 % желатина и 10 % сахарозы на 13,3 %, и ниже, чем при использовании протективной среды из обезжиренного молока и 7,5% глюкозы – на 8,4 %. При использовании данной протективной среды, влажность исследуемого консорциума была наименьшей, как и в двух других подобранных вариантах высушивания консорциума.

Выводы. В процессе исследования выбран оптимальный режим высушивания симбиотического консорциума *Zygosaccharomyces kombuchaensis* и *Gluconacetobacter xylinus*, обеспечивающий максимальную выживаемость клеток, предусматривающий интенсивный влагосъем в самом начале сушки и прогрев до температуры не выше +32-35 °С на протяжении всего времени сушки и использование протективной среды, состоящей из 1 % желатина, 5 % глутамата натрия и 5 % сахарозы.

Литература:

1. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных исследований. – 2016. – 3:5. – С.12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12
2. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения // Микробиология. – 2011. – Т.80, №6. – С.6.
3. Adams G. The Principles of Freeze-Drying / Methods Mol. Biol. – 2007. – 368:15 – P.38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
4. Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-Ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V. Formulation and stabilization of *Francisella tularensis* live vaccine strain. // J. Pharm. Sci.. – 2011. – Т.100, №8. – P.76–87. DOI: 10.1002/jps.22563
5. Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E, Hugo A., Gómez-Zavaglia A., Schebor C. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – Т.155, №3. P.17–21.

Қуауқутеуы

1. Gracheva I.V., Osin A.V. Mexanizmy` povrezhdenij bakterij pri liofilizacii i protektivnoe dejstvie zashhitny`x sred //Problemy` osobo opasny`x issledovanij. – 2016. – 3:5. – S.12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12
2. Kupletskaya M.B., Netrusov A.I. Zhiznesposobnost` liofilizirovanny`x mikroorganizm posle 50 let xraneniya // Mikrobiologiya. – 2011. – T.80, №6. – S.6.
3. Adams G. The Principles of Freeze-Drying / MethodsMol. Biol. – 2007. – 368:15 – P.38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
4. Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-Ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V. Formulation and stabili- zation of Francisella tularensis live vaccine strain. // J. Pharm. Sci.. – 2011. – T.100, №8. – R.76–87. DOI: 10.1002/jps.22563
5. Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E, Hugo A., Gómez- Zavaglia A., Schebor C. Effect of physical properties on the stability of Lactobacillus bulgaricus in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – T.155, №3. R.17–21.