

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРАДИЦИОННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И НОВАЯ КАПУСТНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛАКТОБАКТЕРИЙ*

Аннотация. Разработана новая капустная среда для культивирования лактобактерий, в качестве стимулятора роста к которой добавляли ферментативный гидролизат из тибетского молочного гриба.

Ключевые слова: гидролизат, лактобактерии, стимулятор роста, тибетский молочный гриб, питательная среда.

Лактобактерии являются ауксотрофными организмами и поэтому чрезвычайно требовательны к искусственным питательным средам. Для стимуляции их роста в питательную среду вносят различные добавки: дрожжевой экстракт, твин-80, дрожжевой автолизат, который содержит ценные растворимые формы белка и витамины группы В [2; 13]. Установлено, что некоторые пептиды и аминокислоты (L-аргинин солянокислый, цистеин солянокислый) усиливают рост молочнокислых бактерий [9; 17]. С целью гидролиза белков для перевода их в более доступную для лактобактерий форму (пептиды, аминокислоты) используют протеолитические ферменты. Для роста молочнокислых бактерий необходима различная степень гидролиза белков протеолитическим ферментом. Также выявлено, что для роста лактобактерий требуются не только продукты гидролиза белков, но и нативный белок [2].

Имеется большой перечень питательных сред, используемых для культивирования лактобактерий, однако не всегда искусственная среда отвечает питательным потребностям лактобактерий. Так, например, классическая МРС-среда, широко используемая на практике, не всегда оптимальна в отношении органического азота, источников марганца, магния, фосфора [14]. Одна из модификаций классической среды, МРС-1 [16], также имеет недостатки, а именно: высокая стоимость из-за наличия дорогостоящего импортного вещества – цистеина солянокислого; нестандартность из-за наличия в составе среды в качестве источника азота гидролизованного молока по Богданову; сложность технологии приготовления среды из-за операции суспендирования в горячей воде пептона перед внесением в среду [6].

Предложенная в 2003 году Н.К. Коньковой, И.С. Горловой и Н.А. Голубевой питательная среда для выращивания лактобактерий не обеспечивает достаточно эффективный рост лактобактерий из-за того, что ростовые свойства ее недостаточно высоки и не позволяют нарастить биомассу в культурной среде выше $1,0 \times 10^9$ клеток / мл [8].

В обезжиренном молоке и обычных питательных средах урожай молочнокислых бактерий составляет $1,0 \times 10^9$ - $2,0 \times 10^9$ клеток/мл. Однако молоко как среду для накопления клеток молочнокислых бактерий без специальной предварительной обработки использовать невозможно из-за коагуляции белков, что очень затрудняет отделение клеток [2]. Применяя для выращивания лактобактерий питательных сред, состоящих из триптона, дрожжевого экстракта, глюкозы или лактозы, многие ученые [18; 19; 21] отмечали, что в условиях регулируемого рН удается получать большой урожай клеток. Однако эти среды не целесообразно использовать при массовом производстве бактериального концентрата

* © Тимченко Л.Д., Пенькова Н.И., Катунина Л.С.

виду их высокой себестоимости [2].

С целью снижения стоимости бактериальных препаратов для наращивания клеток молочнокислых бактерий ряд исследователей использовали сыворотку из-под сыра с добавлением различных компонентов, в том числе и обезжиренного молока. Однако это потребовало дополнительных затрат труда на выделение белков и осветление сыворотки [22]. Для роста молочнокислых бактерий большое значение имеют буферные свойства среды. Сыворотка, например, по сравнению с обезжиренным молоком обладает меньшей буферной емкостью, что отрицательно влияет на накопление в ней клеток. Известно, что такие буферные соли, как натриевые лимонной, фосфорной и уксусной кислот, благоприятно влияют на рост молочнокислых бактерий. В состав казеиново-дрожжевой среды входит дорогостоящий импортный ингредиент – цистеин, что существенно повышает ее стоимость. Кроме того, эта среда, как и МРС-среда, содержит дрожжевой автолизат в количестве 0,65 л на 1,0 л среды. Дрожжевой автолизат не является технологичным компонентом, он имеет консистенцию суспензии, для разделения которой на твердую и жидкую фазы требуется дополнительное дорогостоящее оборудование [7].

Сравнительный анализ известных питательных сред, на которых можно осуществлять культивирование лактобактерий, показывает, что его успешность зависит от качества и состава среды, обусловленных как видом белковой основы, так и спецификой стимулирующих компонентов. Так, многие исследователи для приготовления питательных сред использовали в качестве углеводного источника глюкозу, лактозу, сахарозу [6; 8; 9; 15]. На развитие молочнокислых бактерий существенно влияют различные микроэлементы, присутствующие в среде. В связи с этим используют хлорид натрия, ацетат натрия, двузамещенный цитрат аммония, лимоннокислый натрий, источники марганца, магния и фосфора и железа. Этот факт требует внимательного и целенаправленного подхода к выбору исходного сырья, которое было бы богато вышеперечисленными компонентами. Установлено, что для культивирования лактобактерий во всех вышеперечисленных средах в качестве компонентов используется сырье животного происхождения, а именно сухой ферментативный пептон из казеина, мясной экстракт, гидролизат обезжиренного молока, печеночный экстракт [4; 5; 9; 15].

Однако в ряде стран использование компонентов животного происхождения при производстве иммунобиологических препаратов и вакцин ограничено, что связано с заболеванием крупного рогатого скота губчатой энцефалопатией, а также с тем, что в продуктах животноводства могут содержаться антибиотики, нитраты, химикаты, что отрицательно влияет на культивирование микроорганизмов [11; 20; 23].

Уже давно стали проводиться попытки по замене продуктов животного происхождения растительными [2; 4; 5; 15]. Так, например, еще в 1951 году Федоров М.В. в капустную среду для ароматообразующих молочнокислых бактерий добавлял отвар свежей капусты, а Бычкин П.В. (1964) в качестве основы капустного агара для культивирования молочнокислых бактерий использовал капустный сок. Для стимуляции роста лактобактерий и увеличения выхода их бактериальной массы на питательных средах апробировали нативный сок моркови [10].

Использование растительных компонентов может позволить усовершенствовать имеющиеся и разработать новые эффективные питательные среды для молочнокислых бактерий. Перспективность таких сред связана, по нашему мнению, и со сравнительной оценкой себестоимости растений и различных продуктов животного происхождения, при использовании их как основы или компонента питательных сред для культивирования лактобактерий. Однако перечень питательных сред на растительной основе, на которых можно выращивать лактобактерии, невелик. Учитывая высокую потребность в таких средах, связанную с интенсификацией производства бактериальных препаратов для кор-

рекции нарушений микробиоценоза организма человека и животных, проблема разработки новых и совершенствования имеющихся питательных сред для культивирования лактобактерий остается актуальной.

В этом плане целью нашего исследования явилась разработка новой питательной среды на основе растительного сырья, которое должно, в первую очередь, отвечать питательным потребностям лактобактерий, а также не должна быть дорогостоящей. В связи с этим в качестве основы для приготовления питательной среды мы использовали ферментативный гидролизат капусты (ФГК). Капуста – растительное сырье, имеющее уникальный состав: сахара, пектиновые вещества, крахмал, клетчатка, белки, пантотеновая кислота, тартроновая кислота, каротин, витамины (С, Р, В, РР, К, D и U), микро- и макроэлементы (калий, натрий, кальций, магний, железо, фосфор, сера, хлор, а также кобальт, фтор, йод, молибден, медь, цинк, кремний) [12]. По нашему мнению, это сырье имеет богатый минеральный, углеводный, органический и витаминный состав, который может удовлетворить питательные потребности лактобактерий. Однако с учетом питательной специфичности лактобактерий важнейшее значение мы уделили выбору дополнительного стимулирующего компонента среды. Для обеспечения эффекта активизации роста в питательную среду был добавлен ферментативный гидролизат (ФГ) из колоний тибетского молочного гриба (ТМГ) и его молочного настоя (1:1), в количестве 1 и 2 % к общему объему среды. ТМГ является сложной биологической субстанцией, обладающей мощными факторами роста, состоящей из нескольких бактериальных компонентов, молочных и дрожжеподобных микроорганизмов. Установлено, что в настое ТМГ обнаружены: лизин солянокислый, пролин, валин, треонин, фенилаланин и другие неразделенные аминокислоты, которые являются факторами роста молочнокислых бактерий. Не менее важным при определении качества и полезности пищевого продукта является содержание в нем определенных витаминов (В₁, В₂, В₅, В₁₂, РР, А и D), фолиевая кислота, ферменты, кислоты, легко усвояемые белки и полисахариды, а также микро- и макроэлементы (кальций, железо, йод, цинк) [1; 3; 12].

В состав новой капустной среды, кроме ФГК и ФГТМГ, включены: дистиллированная вода, MnSO₄, печеночная вода, дрожжевой автолизат, цистеин солянокислый, цитрат натрия, ацетат натрия уксуснокислый, пептон, глюкоза, Твин-80, микробиологический агар.

На новой питательной среде испытывали тест-штаммы: *L. plantarum* 8P-A3, *L. fermentum* 90T-C4 и *L. acidophilus* EP 317-402. Взятые сухие культуры по оптическому стандарту мутности ОСО, ГИСК им. Л.А. Тарасевича серийными десятикратными разведениями в физиологическом растворе в объеме 4,5 мл доводили до содержания в 1 мл 100 микробных клеток. Из каждого разведения высевали стерильной пипеткой по 0,1 мл (10 микробных клеток) на три чашки Петри. Культивирование лактобактерий осуществлялось в термостате при 37°C.

Целесообразность добавления к капустной основе стимулирующей добавки доказана экспериментально при сравнении с капустной средой без добавления стимулятора роста, что отражено в таблице.

Установлено, что использование новой капустной питательной среды для культивирования лактобактерий даже при минимальных его концентрациях ТМГ, применяемого в качестве стимулятора, оказало высокий ростостимулирующий эффект, независимо от его количества, по сравнению с контролем.

При исследовании культурально-морфологических и биохимических свойств выращенных тест-штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. fermentum* 90T-C4 и *L. acidophilus* EP 317-402 доказана их неизменность по сравнению с классическими характеристиками [13].

Ростовые качества новой питательной среды в зависимости
от количества добавленного ТМГ

Наименование среды	Посев лактобактерий в дозе 10 м.к.		
	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	<i>L. fermentum</i> 90T-C4	<i>L. acidophilus</i> EP 317-402
Капустная среда с добавлением 1 % ФГТМГ	3 колонии, D = 1,8-2,0 мм	10 колоний, D = 2,0 мм	11 колоний, D = 2,0 мм
Капустная среда с добавлением 2 % ФГТМГ	7 колоний, D = 2,0 мм	14 колоний, D = 2,0 мм	13 колоний, D = 2,0-2,2 мм
Капустная среда без добавления ФГТМГ (контроль)	3 колоний, D = 1,0 мм	5 колоний, D = 1,5 мм	5 колоний, D = 2,0 мм

Ростовые качества новой питательной среды особенно выражены при культивировании *L. acidophilus* EP 317-402 и *L. fermentum* 90T-C4 при добавлении 2 % ТМГ к объему.

Таким образом, питательная среда с ФГК и ФГТМГ является пригодной для культивирования лактобактерий. С учетом этого, а также ее низкой себестоимости, открываются широкие перспективы ее промышленного использования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Афанасьева О.В. Лечение молочным грибом / О.В. Афанасьева. – СПб.: Астрель, 2007. – 45 с.
- Банникова, Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.
- Буторина О. Чайный гриб и Тибетский молочный гриб / О. Буторина. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. – 84 с.
- Бычкин П.В. Практикум по микробиологии / П.В. Бычкин, С.С. Гительсон, Н.Б. Агабабова. – М.: Колос, 1964.
- Дзержинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов: учеб. пособие / И.С. Дзержинская. – Астрахан. гос. техн. ун-т. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. – 348 с.
- Конькова Н.К. Питательная среда для выращивания лактобактерий /RU 2216587 С2 // Н.К. Конькова, И.С. Горлова, Н.А. Голубева. – 2003.
- Конькова Н.К. Пути усовершенствования питательных сред, используемых в технологии производства медицинских и ветеринарных пробиотиков / Автореф. дисс. канд. биол. наук. – Н. Новгород, 2002. – 21 с.
- Марьин В.А. Питательная среда для культивирования бифидо- и лактобактерий / № 2004136432/13 // В.А. Марьин, Е.И. Райдна. – 2006.
- Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова; А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук [и др.]. // Учеб. пособие для студ. высш. уч. завед. - М.: Издат. центр «Академия», 2005.
- Овод А.С. Направленное формирование бактериоценоза кишечника / А.С. Овод // Журн. Ветеринария. – М., 2005. – С. 23-26.
- Панова Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий: дис...канд. биол. наук: 03.00.23, 03.00.07 / Н.В. Панова. – Ставрополь, 2006. – 173 с.
- Романова О.В. Лечебные грибы для вашего здоровья / О.В. Романова. – СПб.: Невский проспект, 2006. – 36 с.
- Степаненко П.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии молока и молочных продуктов / П.П. Степаненко. – М., 2005. – 653 с.
- Ткаченко Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко, Ю.П. Успенский. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 590 с.
- Федоров М.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М. В. Федоров. – М.: Гос. изд-во с.-х. литературы, 1951.
- ФС 42-252 ВС 89 «Лактобактерин сухой».

17. Шапошников В.Н. Физиология обмена веществ микроорганизмов в связи с эволюционной функцией / В.Н. Шапошников. — М., Изд-во АН СССР, 1960. — 162 с.
18. Accolas J.P. Conservation a letat congele de suspensions de bacteries lactique concentrees sous faible volume I / J.P. Accolas, J. Auclair // Bacteries lactiques mesophiles. — «Le Lait», 1967. Vol. 47, № 465-466. — P. 253-260.
19. Bergere I.L. Production massive de cellules de streptocoques lactiques / I.L. Bergere // III Production de differents souches en culture a pH constant. — «Le Lait», 1968. Vol. 48, №1. — P. 131-139.
20. Corrigan P.J. Pesticide residues in Australian meat / P.J. Corrigan, P. Seneviratna // Veter. Rec. — 1989. — T. 125. — № 8. — P. 181-184.
21. Gilliland S.E. Antagonistic action of Lactobacillus acidophilus toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures // S.E. Gilliland, M.L. Speck. — J. Food Prot. 1977, № 40. — P. 820-823.
22. Valles E. Preparation de suspensions concentrees et congelées de bacteries lactiques thermophilus destinees a la fromagerie / E. Valles, G. Macquot // «Le lait», 1968. — Vol. 48. - № 397-480. — P. 631-643.
23. Waguespack M. Eliminating residue in «Bob» veal calves / M. Waguespack // Anim. Health Nutrit, 1986. — Vol. 41, № 6. — P. 28-30.

L. Timchenko, N. Penkova, L. Katunina

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF TRADITIONAL NUTRIENT MEDIUMS AND THE NEW CABBAGE ENVIRONMENT FOR CULTIVATION LACTOBACTERIUM

Abstract. The new cabbage environment for cultivation Lactobacterium is developed, as a growth factor to which added fermentativity gidrolizat from the Tibetan dairy mushroom.

Key words: gidrolizat, Lactobacterium, a growth factor, the Tibetan dairy mushroom, a nutrient medium.