

УДК 579.872.1

UDC 579.872.1

03.00.00 Биологические науки

Biology

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII* НА ОСНОВЕ СОКА ИЗ ТОМАТОВ В КАЧЕСТВЕ НАПОЛНИТЕЛЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ENHANCEMENT OF CULTURE MEDIA FOR *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII* ON THE BASIS OF TOMATO JUICE AS VEGETABLE FILLING

Волобуева Елена Сергеевна
аспирант
РИНЦ SPIN-код 7617-5411

Volobueva Elena Sergeevna
postgraduate student
RSCI SPIN-code 7617-5411

Анискина Мария Владимировна
аспирант
РИНЦ SPIN-код 1255-4837

Aniskina Mariya Vladimirovna
postgraduate student
RSCI SPIN-code 1255-4837

Петенко Александр Иванович
д. с-х. н., профессор
РИНЦ SPIN-код 7870-5435

Petenko Alexander Ivanovich
Dr.Sci.Agr., professor
RSCI SPIN-code 7870-5435

Гнеуш Анна Николаевна
аспирант
РИНЦ SPIN-код: 2342-8682
*Кубанский государственный аграрный университет,
Краснодар, Россия*

Gneush Anna Nikolaevna
postgraduate student
RSCI SPIN-code 2342-8682
*Kuban State Agrarian University, Krasnodar,
Russia*

В данной статье представлены материалы по подбору питательной среды для культивирования *Propionibacterium shermanii*, а также ее оптимизации. Показан высокий положительный эффект, выражающийся в интенсивном росте микроорганизмов *Propionibacterium shermanii* на оптимизированной питательной среде с томатным соком, а также заменой глюкозы на кукурузный экстракт, который позволяет сделать вывод о том, что эти компоненты положительно влияют на накопление биомассы *Propionibacterium shermanii*

The article presents materials about selection and optimization of the nutrient medium for cultivation of *Propionibacterium shermanii*. We have shown a high positive effect expressed in the intensive growth of microorganisms of *Propionibacterium shermanii* on optimized medium with the juice from the tomatoes, as well as replacement of glucose on corn extract, which allows concluding that these components have a positive impact on the accumulation of biomass of *Propionibacterium shermanii*

Ключевые слова: ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, СОК ИЗ ТОМАТОВ, ШТАММ *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Keywords: NUTRIENT MEDIUM, MICROORGANISM CULTIVATION, TOMATO JUICE, *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII* STRAIN

Введение

В связи с нарастающими объемами производства сельскохозяйственной продукции в России и, в частности, в Краснодарском крае, а также в соответствии с Указом Президента Российской Федерации от 6 августа 2014 г. № 560 "О применении отдельных специальных экономических мер в целях обеспечения безопасности Российской Федерации" возникает потребность в недорогих

и доступных, импортозамещающих товарах.

Краснодарский край занимает лидирующие позиции по переработке растительной продукции. Кроме того, в крае сосредоточено множество предприятий животноводческой сферы, которые нуждаются в поставках высококачественных кормов для сельскохозяйственных животных и птицы.

Анализ как ассортимента представленных на отечественном рынке питательных сред для пропионовокислых бактерий, так и кормов и кормовых добавок с их добавлением свидетельствует о целесообразности расширения растительных источников для приготовления питательных сред и кормов. На основании потребностей пропионовокислых микроорганизмов в различных веществах, содержащихся в питательных средах, установлено, что предпочтительным компонентом в технологии производства питательных сред является томатный сок. А также он является экономически выгодным ингредиентом. На территории нашего края выращивается большое количество томатов, которые впоследствии можно перерабатывать в томатный сок. Он обладает высокой пищевой ценностью и функциональными свойствами.

Материал и методика. На основании проведенных ранее исследований по поведению пропионовокислых микроорганизмов в различных питательных средах (Волобуева Е.С., Анискина М.В., Петенко А.И., Волкова С.А.) [1,2] выявлено, что вносить в среду томатный сок целесообразно и рентабельно.

Лабораторная часть данного исследования была проведена на территории Кубанского Государственного Аграрного Университета, на факультете перерабатывающих технологий, кафедре биотехнологии, биохимии и биофизики.

Сухую лиофилизированную закваску штамма *Propionibacterium shermanii*, произведенную на экспериментальной биофабрике

Россельхозакадемии (г. Углич, ул. Старостина, 18), восстанавливали в обезжиренном молоке.

Характеристики лиофилизированной закваски пропионовокислых микроорганизмов:

1. Внешний вид - однородный порошок, молочно-белого, равномерного по всей массе цвета, со специфическим для данной закваски запахом.

2. Массовая доля влаги 3,2 %, гидрофильность 85 %.

3. Количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий в 1 см³, не менее 8×10^9 . Клетки на молоке имеют форму кокковидных цепочек и диплококковидных клеток. При внесении в обезжиренное молоко порошок растворился за 1 минуту.

4. Бактерии группы кишечной палочки, патогенные и плесневые клетки не обнаружены.

Исходя из этого ясно, что сухая закваска пропионовокислых бактерий имеет хорошую растворимость, повышенную гидрофильность (85 %), и отсутствуют патогенные клетки и бактерии группы кишечной палочки, что говорит о ее высоком качестве. Также она характеризуется отличными органолептическими и физико-химическими показателями.

После культивирования проводилась идентификация микроорганизмов методикой окрашивания по Граму в соответствии с ГОСТ 21237-2006.

Помимо этого был приготовлен ряд последовательных разведений чашечным методом Коха для получения изолированных колоний пропионовокислых микроорганизмов и их подсчета.

Далее был произведен посев микроорганизмов: по 1 мл полученных на предыдущем этапе разведений вносили в чашки Петри, сверху заливали питательной средой Эллингера (простерилизованной и охлажденной до

температуры 40 °С). Выполняли посев в пяти повторностях и приводили к среднему результату.

Для стерилизации среды были предварительно помещены в автоклав (температура 101 °С, давление 1 атм.). Время стерилизации 20 минут.

Количество бактерий определяли методом, основанном на подсчете колоний исследуемых микроорганизмов, которые росли на агаризованной питательной среде. Ежедневно производились подсчеты визуализированных колоний на чашках Петри и данные заносились в лабораторный журнал в течении 6 дней.

Общее количество микроорганизмов (КОЕ), которые содержатся в 1 см³ среды, вычисляется по формуле:

$$X = n \times 10^m, \quad (1)$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри,

m – число десятикратных разведений

КОЕ (колониобразующие единицы) – это показатель количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 см³, одного миллилитра жидкости. Это наиважнейший показатель полезности пробиотических продуктов – количество живых бактерий.

В питательных средах проводилось измерение активной кислотности на рН метре «Нанна» (прибор электронный, автоматизированный, со съемным электродом) для установления количества ионов водорода. Измеренную кислотность питательных сред прибор сравнивает с кислотностью эталонных буферных растворов.

Определение бактерий группы кишечной палочки, а также дрожжевых и плесневых клеток заключалось в возможности бактерий группы кишечной палочки расщеплять глюкозу и лактозу. Готовилась сухая питательная среда Кесслер (ТУ 9291-155-00008064-97) темно-

фиолетовой окраски. И сухая питательная среда Кода (ТУ 9291-091-04610209-2000) зеленой окраски. Присутствие в питательных средах бактерий группы кишечной палочки определяют высевом из забродивших пробирок со средой Кесслер в чашки Петри со средой Эндо. Далее чашки помещали в термостат (температура 37 °С). И через 18-20 ч просматривали посеvy. На среде Эндо бактерии группы кишечной палочки должны показать темно-красные колонии с металлическим блеском или розово-красные без блеска. Из неспецифических колоний готовили мазки, которые окрашивали методом по Граму. Специфическое изменение среды Кода не требует дальнейшего подтверждения.

Результаты исследований и их обсуждение.

В работе был проведен ряд испытаний, по изучению различных характеристик микроорганизмов в различных питательных средах. Изучали поведение микроорганизмов.

В результате проведенных исследований была оптимизирована питательная среда для штамма *Propionibacterium shermanii*.

В таблице 1 представлен состав исследуемых питательных сред с добавлением томатного сока.

Таблица 1 – Состав исследуемых питательных сред с добавлением томатного сока в различных концентрациях

Компоненты	Концентрация, на литр			
	Среда 1	Среда 2	Среда 3	Контроль
Томатный сок	150 мл	150 мл	150 мл	-
Глюкоза	10 г	-	10 г	10 г
Пептон	5 г	5 г	5 г	5 г
Дрожжевой экстракт	5 г	5 г	5 г	5 г
Кукурузный экстракт	-	10 г	10 г	10 г

Исследуемые питательные среды были составлены нами исходя из потребностей пропионовокислых микроорганизмов в питательных

веществах. За контроль принята питательная среда, в состав которой не входит томатный сок. Характеристика компонентов, входящих в состав питательных сред представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Краткая характеристика компонентов питательных сред

Компонент	Характеристика
Томатный сок	Сок из томатов собственного приготовления. Предварительно приготовлен из свежих отборных томатов по ГОСТ Р 52183-2003, несколько раз отфильтрованный через марли, фильтровальную бумагу, после стерилизованный.
Глюкоза	Д-глюкоза, водная. Из сока фруктов и ягод. Бесцветные кристаллы.
Пептон	Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Препарат, полученный из молока и мяса животных под действием протеолитических ферментов. Содержит пептиды, жиры, металлы, соли, витамины и много других органических и минеральных веществ.
Дрожжевой экстракт	Продукт, получаемый из дрожжевого автолизата, при помощи 4 кратного разведения водой и последующим фильтрованием или центрифугированием с целью удаления нерастворимых (твердых) компонентов. После мягкого высушивания может длительное время храниться в порошке. Партия №031007411 FK.
Кукурузный экстракт	Рафинированный, светлый. Экстракт, изготавливаемый из кукурузного крахмала. Гидролизат кукурузного крахмала.

Для анализа эффективности культивирования была приготовлена плотная питательная среда Элингера, состав которой приведен в таблице 3.

Таблица 3 - Компонентный состав питательной среды Эллингера

Ингредиенты	Масса, г/л
Глюкоза	5
Казеин	5
Ацетат натрия	1,5
Сахароза	5
Дрожжевой экстракт	5
Лактоза	5
NaCl	4
Желатин	2,5
Аскорбиновая кислота	2,5
Агар	18

Из колб с питательными средами производился высеv на чашки Петри с плотной средой Эллингера в пятикратной повторности. Чашки помещали в термостат при 30 °С на 7 суток. Ежедневно проводили подсчет колоний пропионовокислых микроорганизмов на чашках Петри.

Для анализа сред использовали метод подсчета колоний микроорганизмов по ГОСТ 26670-2008, а также измеряли активную кислотность (рН) во всех средах.

Активная кислотность во всех испытуемых средах была от 5,67 до 6,01, что благоприятствует росту выбранных нами пропионовокислых микроорганизмов.

Бактерии группы кишечной палочки, плесневые и дрожжевые клетки в готовой питательной среде не выявлены.

Проведенный высеv микроорганизмов на среду Эллингера из исследуемых сред показал следующую динамику роста пропионовокислых микроорганизмов, которая отражена в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты исследования

Наименование штамма и исследуемая среда	Продолжительность культивирования, ч	Количество колоний
<i>Propionibacterium shermanii</i> на среде 1	24	$2,5 \times 10^8$
	48	$8,6 \times 10^8$
	72	$4,9 \times 10^9$
	96	$6,4 \times 10^9$
	120	$6,7 \times 10^9$
	144	$9,2 \times 10^8$
<i>Propionibacterium shermanii</i> на среде 2	24	$4,5 \times 10^8$
	48	$7,6 \times 10^8$
	72	$5,8 \times 10^9$
	96	$7,9 \times 10^9$
	120	$8,2 \times 10^9$
	144	$4,2 \times 10^9$
<i>Propionibacterium shermanii</i> на среде 3	24	$2,5 \times 10^8$
	48	$8,6 \times 10^8$
	72	$6,1 \times 10^9$
	96	$8,0 \times 10^9$
	120	$8,4 \times 10^9$
	144	$5,5 \times 10^9$
<i>Propionibacterium shermanii</i> на контрольной среде	24	$2,9 \times 10^6$
	48	$5,5 \times 10^7$
	72	$1,5 \times 10^8$
	96	$2,3 \times 10^8$
	120	$4,2 \times 10^8$
	144	$3,6 \times 10^8$

Таким образом, нами было выяснено, что проводить замену глюкозы на кукурузный экстракт целесообразно, ввиду того, что это положительно

влияет на динамику роста штамма *Propionibacterium shermanii*. Также подтверждаются ранее проведенные исследования о положительной динамике роста микроорганизмов при внесении в среду томатного сока (Волобуева Е.С., Анискина М.В., Петенко А.И., Волкова С.А.) [1,2].

Накопление биомассы пропионовокислых микроорганизмов идет до 5 суток, после чего начинает снижаться. Следовательно именно этот период принят за рекомендуемое время выращивания.

Рассчитана себестоимость всех исследуемых сред и контрольной среды. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Себестоимость сред

Исследуемая среда	Стоимость, руб
Среда 1	32,2
Среда 2	33,1
Среда 3	36,9
Контрольная среда	27,5

Исходя из приведенных в таблице расчетов, можно сделать вывод, что предлагаемые среды имеют низкую стоимость, а лучшая по итогам исследований среда незначительно дороже контрольной при высокой эффективности, что делает ее рентабельной.

Выводы. Наилучшие результаты пропионовокислые микроорганизмы показали на средах №2 и №3. Совместное использование глюкозы и кукурузного сиропа на среде №3 также дает хороший рост микроорганизмов, но он незначительно превышает рост на среде №2, где глюкоза отсутствовала. Следовательно, лучшей по результатам данного исследования является среда №2, в которой соотношение цена - качество - эффективность является оптимальным.

Так, мы рекомендуем к применению среду с добавлением томатного сока и кукурузного сиропа. Высокий положительный эффект,

выражающийся в интенсивном росте микроорганизмов *Propionibacterium shermanii* на усовершенствованной питательной среде с соком из томатов, а также заменой глюкозы на кукурузный экстракт позволяет сделать вывод, что эти компоненты положительно влияют на накопление биомассы пропионовокислых микроорганизмов. Культуру рекомендуется выращивать в течение 120 часов (5 суток).

Литература

1. Анискина. М.В. Изучение особенностей культивирования и подбор оптимальной питательной среды для *Lactobacillus* sp /Анискина М.В., Волобуева Е.С., Волкова С.А., Петенко А.И. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2015. – №114(10). – IDA [article ID]: 1141510087 Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/10/pdf/87.pdf>

2. Волобуева Е.С. Особенности культивирования штамма *Propionibacterium shermanii* / Волобуева Е.С., Анискина М.В., Волкова С.А., Петенко А.И.// Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2015. – №114(10). – IDA [article ID]: 1141510088 Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/10/pdf/88.pdf>

References

1. Aniskina. M.V. Izuchenie osobennostej kul'tivirovaniya i podbor optimal'noj pitatel'noj sredy dlya *Lactobacillus* sp /Aniskina M.V., Volobueva E.S., Volkova S.A., Petenko A.I. // Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [EHlektronnyj resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2015. – №114(10). – IDA [article ID]: 1141510087 Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2015/10/pdf/87.pdf>

2. Volobueva E.S. Osobennosti kul'tivirovaniya shtamma *Propionibacterium shermanii* / Volobueva E.S., Aniskina M.V., Volkova S.A., Petenko A.I.// Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [EHlektronnyj resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2015. – №114(10). – IDA [article ID]: 1141510088 Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2015/10/pdf/88.pdf>