

В.А. Марьин, Д.В. Харитонов

ИССЛЕДОВАНИЕ СХЕМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФАЗ РОСТА ПЕРИОДИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ ИЛИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Исследованы две новые схемы последовательности фаз роста микроорганизмов. Доказано наличие фазы линейного роста культуры после фазы экспоненциального роста. Экспериментально обоснована реальность и разнотипность каждой из новых схем. Показано, что только совокупность трех упомянутых схем охватывает все многообразие режимов роста микроорганизмов.

Фазы роста микроорганизмов, бифидобактерии, лактобактерии.

Опыт мировой практики показывает, что в молочной промышленности все большее распространение начинают получать закваски и бактериальные концентраты прямого внесения, как замороженные, так и высушенные сублимацией. Повышение активности и увеличение сроков хранения их является важной задачей, решение которой обеспечивается совершенствованием процессов производства.

В последнее время во ВНИМИ на основании государственного контракта в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по

приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» по теме «Разработка технологий универсального, быстро переориентируемого производства заквасок прямого внесения для биотехнологической промышленности» ведутся работы по совершенствованию технологии производства бакконцентратов для молочной промышленности.

В настоящее время получила широкое распространение схема фаз роста культуры микроорганизмов (рис. 1) [1, 2].

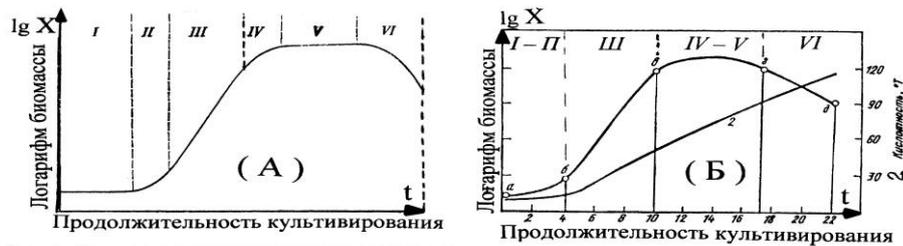


Рис. 1. Схема последовательности фаз роста при экспоненциальном росте периодической культуры. (А) – подробная, (Б) – краткая. I – II – лаг-фаза; III – фаза экспоненциального роста; IV – V – стационарная фаза роста; VI – фаза отмирания культуры.

Оба варианта (подробный и краткий) схемы с требуемой полнотой демонстрируют последовательность фаз роста *кишечной палочки* (*E. coli*), детально изученную в серии исследований Ж. Моно [3]. В частности, Ж. Моно показал, что после лаг-фазы рост культуры *E. coli* протекает в фазе экспоненциального роста, затем наступают стационарная фаза роста и фаза отмирания культуры микроорганизмов. Легко убедиться, что фаза линейного роста микроорганизмов в обоих вариантах схемы отсутствует.

Экспериментальные исследования, проведенные во ВНИМИ, показали, что рост лактобактерий в молоке и молочной сыворотке принципиально отличается от роста культуры *E. coli* (в другой среде) тем, что фаза экспоненциального роста у большинства видов лактобактерий полностью отсутствует. Другими словами, общепризнанная схема непригодна для характеристики роста лактобактерий в молоке и сыворотке. Следовательно, общепризнанная «классическая» схема последовательности фаз роста периодической культуры не является ни универсальной, ни тем более единственной.

В ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии проводятся теоретические и экспериментальные фундаментальные исследования с целью изучения закономерностей

и особенностей роста и отмирания молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий. Разработаны новые модификации рН-метрического метода, позволяющие наглядно выявить режимы роста лактобактерий (или бифидобактерий) на всем протяжении процесса культивирования. В настоящее время детально исследованы ранее известные, а также новые закономерности и особенности роста бифидобактерий и лактобактерий в молоке и других питательных средах в широком диапазоне условий роста микроорганизмов.

Доказано теоретически и обосновано экспериментально, что прирост концентрации бифидобактерий (ΔX) или лактобактерий в сквашиваемой питательной среде прямо пропорционален одновременно (взаимосвязанному) приросту титруемой кислотности (ΔA) среды [4]:

$$\Delta X [\text{КОЕ/мл}] = 4,8 \cdot 10^7 \Delta A [^\circ\text{T}]. \quad (1)$$

В ходе создания новой модификации рН-метрического метода экспериментально установлено, что прирост титруемой кислотности (ΔA) сквашиваемых питательных сред прямо пропорционален

взаимосвязанной убыли рН среды ($-\Delta\text{pH}$) согласно формуле (2):

$$\Delta A [^{\circ}\text{T}] = b \cdot (-\Delta\text{pH}) \quad (2)$$

$$\Delta A/\Delta t [^{\circ}\text{T}/\text{час}] = b \cdot (-\Delta\text{pH}/\Delta t); \quad (3)$$

$$\Delta X/\Delta t [\text{КОЕ}/\text{мл}\cdot\text{час}] = 4,8 \cdot 10^7 \Delta A/\Delta t [^{\circ}\text{T}/\text{час}], \quad (4)$$

где b [$^{\circ}\text{T}/\text{единицу}$ убыли рН] – *буферность* сквашиваемой среды.

Новая модификация рН-метрического метода включает следующие основные операции.

1. Предварительное определение (рН-метрическим титрованием) буферности (b) используемой (жидкой) питательной среды. *Оригинальная авторская методика определения буферности сред (и водных растворов солей) приведена в сборнике научных трудов ГНУ ВНИМИ [6].*

2. Подробный мониторинг рН сквашиваемой среды и построение *рН-метрической кривой*, т.е. графика зависимости рН среды от продолжительности процесса сквашивания (t). На графике ось рН должна быть направлена *вниз*, тогда рН-метрическая кривая одновременно является кривой роста титруемой кислотности сквашиваемой среды. РН-метрическую кривую целесообразно строить *во время процесса сквашивания*, чтобы по изменению ее конфигурации наблюдать *в режиме реального времени* смену фаз роста культуры и изменение скорости роста лактобактерий.

3. Расчет по формуле (3) скоростей кислотообразования культуры ($\Delta A/\Delta t$ [$^{\circ}\text{T}/\text{час}$]) по результатам мониторинга рН сквашиваемой среды и построение *кривой скоростей роста* титруемой кислотности среды, т.е. графика зависимости $\Delta A/\Delta t$ от t (см. рис. 2–7).

4. Расчет по формуле (4) скорости роста культуры $\Delta X/\Delta t$ [КОЕ/мл·час] для любого выбранного периода процесса культивирования бифидобактерий или лактобактерий.

В качестве иллюстрации сказанного выше на рис. 2 приведены рН-метрическая кривая роста *Str. thermophilus* в питательной среде Vis-start TW 50 с добавками молока и сыворотки и рассчитанная на ее основе кривая скоростей роста той же культуры. Для каждого прямолинейного участка рН-метрической кривой рассчитаны по формуле (3) и указаны значения $\Delta A/\Delta t$ [7].

На рН-метрической кривой неизменность скорости роста и кислотообразования бифидобактерий (или лактобактерий) проявляется в виде *строго прямолинейного* участка или нескольких участков, которые легко выявить и отличить от единственного *криволинейного участка экспоненциального роста*, при котором скорость роста микроорганизмов непрерывно возрастает.

В рассматриваемом примере (см. рис. 2) два начальных прямолинейных участка рН-метрической кривой (две ступени) относятся к периоду лаг-фазы. В период лаг-фазы скорость кислотообразования культуры *ступенчато* возросла (скачком) на границе ступеней роста с 2,7 до 10 $^{\circ}\text{T}/\text{час}$. Согласно формуле (4) скорость кислотообразования 10 $^{\circ}\text{T}/\text{ч}$ соот-

ветствует скорости роста культуры *Str. thermophilus* ($\Delta X/\Delta t$) = $4,8 \cdot 10^8$ КОЕ/мл·час.

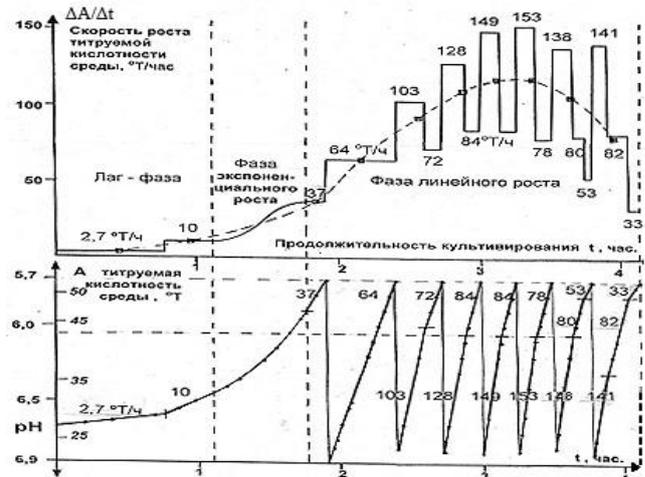


Рис. 2. РН-метрическая кривая роста титруемой кислотности сквашиваемой *Str. thermophilus* среды Vis-start TW 50 с добавками молока и сыворотки (нижняя кривая) и рассчитанная на ее основе кривая скоростей роста титруемой кислотности той же среды (верхняя кривая)

За лаг-фазой следует единственный *криволинейный* участок рН-метрической кривой. Он относится к фазе *экспоненциального роста*. Скорость кислотообразования (и роста) культуры лактобактерий при экспоненциальном росте *возрастает непрерывно* (в данном случае с 10 до 37 $^{\circ}\text{T}/\text{час}$), тогда как при ступенчатом (линейном) росте она *остаётся неизменной* в границах каждой ступени линейного роста.

После фазы экспоненциального роста наступила *фаза линейного роста* (новая фаза роста, открытая В.А. Марьиным в 2002 г.) со *ступенчатым* изменением скорости кислотообразования культуры. Растущую культуру лактобактерий или бифидобактерий периодически раскисляли 25%-ным раствором аммиака. На рис. 2 раскисление среды раствором аммиака обозначено вертикальными линиями.

В фазе линейного роста скорость кислотообразования неоднократно *скачком* снижалась (в 1,5–2 раза), но после раскисления среды вновь возрастала. (Чтобы избежать отмеченных скачков, рН сквашиваемой среды не должен снижаться ниже рН = 6,05.) Штриховой *плавной* линией условно обозначено изменение *средней* скорости кислотообразования культуры.

Многие исследователи уже давно отметили, что в *«поздний период экспоненциального роста»*, (т.е. на самом деле в *фазе линейного роста*) рост микроорганизмов *отличается от экспоненциального*. Но все они традиционно продолжали считать рост культуры *экспоненциальным*.

Высокая чувствительность новой модификации рН-метрического метода впервые позволила четко разграничить участки экспоненциального и линейного роста лактобактерий (и бифидобактерий) на рН-метрической кривой. В первой же серии экспериментов 2002 г. из конфигурации рН-метрических кривых, приведенных на рис. 3–6, стало ясно, что за периодом *экспоненциального* роста лактобактерий и

бифидобактерий *всегда* следует период *линейного* роста культуры [8].



Рис. 3 и 4. pH-метрические кривые роста *B. bifidum* 791 и *Lac. lactis* в среде Vis-start TW-50 (7,5 % СВ) + подсырная сыворотка (5,0 % СВ)

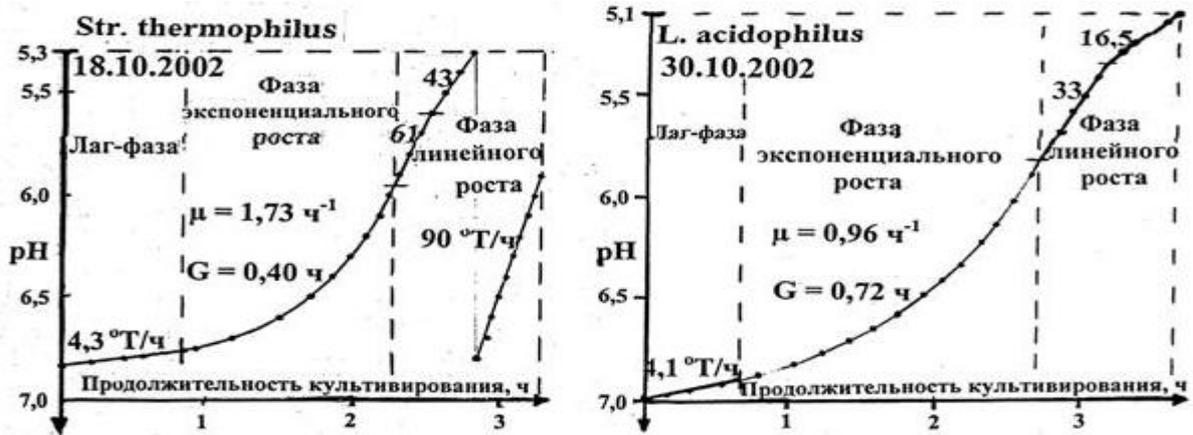


Рис. 5 и 6. pH-метрические кривые роста *Str. thermophilus* и *L. acidophilus* в среде Vis-start TW-50 (5,0 % СВ) + подсырная сыворотка (7,5 % СВ)

Возооноволение (продолжение) *линейного* (а не экспоненциального) роста культуры после раскисления сквашиваемой среды (рис. 3 и 5) означало, что линейный рост протекает при *оптимальных* условиях сквашивания, а не только при высокой кислотности среды. Длительность линейного роста и скорость роста и кислотообразования культуры в этот период превышали такие же показатели в *фазе* экспоненциального роста (рис. 3–5). Следовательно, за фазой экспоненциального роста следует *фаза линейного роста микроорганизмов*.

Прямолинейность начальных участков pH-метрических кривых на рис. 3–6 (в период лаг-фазы) означала, что в период *лаг-фазы* рост микроорганизмов протекает в *режиме линейного роста*.

Эксперименты показали, что при культивировании бифидобактерий в молочной сыворотке (15–25 % СВ) *фаза экспоненциального роста культуры отсутствовала*. Экспериментально установлено, что рост бифидобактерий в *гидролизатно-молочных* средах протекает аналогично росту *Str. thermophilus*, описанному выше.

В дальнейшем было также установлено, что при культивировании большинства видов молочнокислых микроорганизмов в молоке и молочной сыворотке фаза экспоненциального роста полностью отсутствует. Для примера на рис. 7 приведены pH-метрическая кривая роста и кривая скоростей роста *Lac. lactis* в обезжиренном молоке при 30 °С [9].

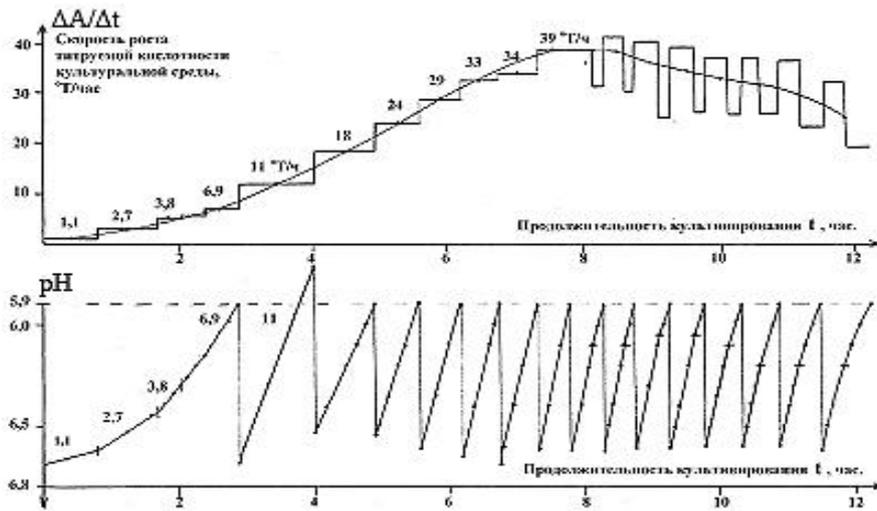


Рис. 7. Линейный рост *Lactococcus lactis* в обезжиренном молоке

В рассмотренном случае рост микроорганизмов на всем протяжении сквашивания протекает *только в режиме линейного роста*, поэтому невозможно разграничить лаг-фазу и фазу линейного роста культуры, так как в обеих фазах рост культуры протекает одностипно в *режиме* линейного роста.

В результате экспериментальных и теоретических исследований дополнительно к общепризнанной схеме разработаны две новые схемы (рис. 8 и 9) последовательности фаз роста периодической культуры, *которые принципиально отличаются от общепризнанной схемы наличием новой фазы роста культуры – фазы линейного роста микроорганизмов* [5].

На рис. 8 приведена первая из двух новых схем, характерной особенностью которой является *отсутствие фазы экспоненциального роста культуры*. Рост микроорганизмов на всем протяжении сквашивания *протекает только в режиме линейного роста*. Согласно этой схеме протекает рост в молоке и молочной сыворотке таких молочнокислых микроорганизмов, как *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, а также бифидобактерий – в среде Блаурокка или в подгущенной (15 % СВ) молочной сыворотке.



Рис. 8. Схема последовательности фаз роста при *линейном* росте культуры. I – II – лаг-фаза и однотипная *фаза линейного роста* (нет границы раздела между ними); III – стационарная фаза роста; IV – фаза отмирания культуры.

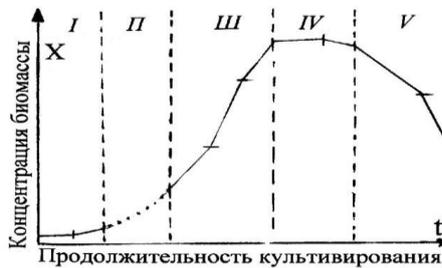


Рис. 9. Схема фаз роста при *экспоненциальном* росте культуры, *переходящем в линейный* рост. I – лаг-фаза; II – фаза экспоненциального роста; III – фаза линейного роста; IV – стационарная фаза роста; V – фаза отмирания культуры.

На рис. 9 приведена вторая из двух новых схем, характерной особенностью которой является *наличие фазы линейного роста культуры после фазы экспоненциального роста*. Согласно этой схеме протекает рост *Streptococcus thermophilus* в молоке, а также рост *всех молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий* в питательных средах, содержащих гидролизаты молочного белка.

Из сказанного следует, что *только совокупность трех рассмотренных разнотипных схем* охватывает все многообразие режимов роста микроорганизмов. Поэтому концепцию *единственной общепризнанной* (на данный момент) *схемы* следует признать устаревшей, отжившей, отказаться от нее и перейти к *общепринятой* (в будущем) *единой совокупности трех основных схем*, рассмотренных выше (рис. 1, 8, 9).

Список литературы

1. Перт, С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток // Oxford London Edinburgh Melbourne, 1975. – М.: Мир, 1978.
2. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: учебник для студентов вузов. – М., 1999. – С. 55.
3. Monod, J. The growth of bacterial cultures // Annual review of microbiology 371–394 (1949), p. 373, 391, fig. 9.

4. Марьин, В.А. Новая закономерность роста культуры бифидобактерий (лактобактерий). Формула Марьина // Принципы пищевой комбинаторики – основа моделирования поликомпонентных пищевых продуктов: сб. материалов Всеросс. науч.-практ. конф. 8–9.09.2010, г. Углич, ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии. – Россельхозакадемия, 2010. – С. 165–168.

5. Марьин, В.А. Двадцатикратное увеличение урожайности жидкого и сухого концентрата бифидобактерий (до $5 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г) обогащением питательной среды комплексом макро- и микроэлементов // Принципы пищевой комбинаторики – основа моделирования поликомпонентных пищевых продуктов: сб. материалов Всеросс. науч.-практ. конф. 8–9.09.2010, г. Углич, ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии. – Россельхозакадемия, 2010. – С. 162–164.

6. Марьин, В.А. Новый способ определения удельной скорости роста (μ) лактобактерий и бифидобактерий // Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ – 80 лет): сб. науч. тр. – М.: ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии, 2010. – С. 279–280.

7. Марьин, В.А. Изучение специфики роста лакто- и бифидобактерий новым рН-метрическим методом / В.А. Марьин, Е.И. Райдна // Нано- и биотехнологии производства продуктов функционального назначения: сб. докл. междунар. науч.-практ. конф. 10–12.10.2007, г. Краснодар, Краснодарский НИИ хран. и пер. с-х. прод., 2007. – С. 173–175.

8. Марьин, В.А. Новая фаза роста микроорганизмов – фаза линейного роста // Нано- и биотехнологии производства продуктов функционального назначения: сб. докл. междунар. науч.-практ. конф. 10–12.10.2007, г. Краснодар, Краснодарский НИИ хран. и пер. с-х. прод., 2007. – С. 176–177.

9. Марьин, В.А. Сопоставление скоростей кислотообразования культур лактобактерий рН-метрическим методом / В.А. Марьин, Е.И. Райдна // Интеграция фундаментальных и прикладных исследований – основа развития современных аграрно-пищевых технологий: сб. материалов науч.-практ. конф. 4–6.09.2007, г. Углич, ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии. – С. 212–214.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
молочной промышленности Россельхозакадемии,
113093, Россия, Москва, ул. Люсиновская, д. 35
Тел./факс: (495) 236-31-64
e-mail: Vnimi5@rambler.ru

SUMMARY

V.A. Marin, D.V. Kharitonov

Investigation of Growth Phase Sequence Schemes of Periodic Culture of Bifidobacterium and Lactobacillus

Two new schemes of sequence of microorganism growth phases have been investigated. The existence of the linear growth phase after the exponential growth phase has been proved. The reality and diversity of types of new schemes have been experimentally substantiated. It has been shown that only the complex of the three mentioned schemes reflect the diversity of microorganism growth conditions.

Microorganism growth phases, bifidobacterium, lactobacillus.

All-Russian Scientific Research Dairy Institute
35, Lyusinovskaya street, Moscow, 115093, Russia
Phone/Fax: (495) 236-31-64
e-mail: Vnimi5@rambler.ru

