

УДК 547:637.136(045)

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

*Т.А. Обрезкова, Н.А. Шавыркина*

*Бийский технологический институт (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (БТИ АлтГТУ), г. Бийск, Россия*

В статье приведены результаты аналитических и экспериментальных исследований влияния на жизнедеятельность молочнокислых бактерий процесса их иммобилизации в структуре бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ). В работе использовали закваску ацидофильной палочки на обезжиренном молоке и бактериальную наноцеллюлозу, полученную статическим культивированием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* на полусинтетической питательной среде. Установлено, что внесение более 5 % БНЦ приводит к образованию сгустка уже на стадии стерилизации, поэтому следует либо вносить меньше этой дозировки, либо изменить способ внесения БНЦ. Иммобилизации бактерий ацидофильной палочки на БНЦ не влечет увеличения численности бактерий, но стимулирует их кислотообразование. Культивирование более 3 суток нецелесообразно, т.к. и кислотность, и численность микроорганизмов по истечению этого времени начинают снижаться, а на 7-е сутки жизнеспособных клеток в образцах не обнаруживается.

**Ключевые слова:** бактериальная наноцеллюлоза, молочнокислые бактерии, иммобилизация.

## THE USE OF BACTERIAL NANOCELLULOSE AS A CARRIER FOR THE IMMOBILIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA

*T.A. Obrezkova, N.A. Shavyrkina*

*Biysk Institute of Technology (branch) of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Altai State Technical University named after I.I. Polzunov" (BTI AltSTU), Biysk, Russia*

The article presents the results of analytical and experimental studies of the influence of the process of their immobilization in the structure of bacterial nanocellulose (BNC) on the vital activity of lactic acid bacteria. The work used a starter culture of acidophilus bacillus in skim milk and bacterial nanocellulose obtained by static cultivation of a symbiotic culture of *Medusomyces gisevii* in a semi-synthetic nutrient medium. It has been established that adding more than 5% BNC leads to the formation of a clot already at the sterilization stage, so you should either add less than this dosage or change the method of adding BNC. Immobilization of acidophilus bacteria on BNC does not increase the number of bacteria, but stimulates their acid formation. Cultivation for more than 3 days is impractical, because both the acidity and the number of microorganisms begin to decrease after this time, and on the 7th day no viable cells are detected in the samples.

**Keywords:** bacterial nanocellulose, lactic acid bacteria, immobilization.

Иммобилизация молочнокислых бактерий является важным процессом в пищевой промышленности. Она позволяет сохранить высокую активность бактерий и обеспечить стабильное качество продукции. Для этого используют различные носители, такие как альгинат, казеин или гель-микрокапсулы. Эти материалы обеспечивают защиту бактерий от внешних

воздействий, таких как изменения температуры, рН или осмотического давления. Благодаря иммобилизации молочнокислых бактерий можно улучшить качество и полезные свойства различных молочных продуктов, таких как йогурты, кефиры или творог.

Первые научные исследования молочнокислых бактерий были проведены Л. Пастером, результаты он опубликовал в 1857 г. С тех пор молочнокислые бактерии привлекают к себе внимание специалистов. На основе использования этих микроорганизмов создаются и развиваются крупные отрасли пищевой промышленности [6].

Молочнокислые бактерии играют важную роль в производстве многих молочных продуктов. Они способствуют брожению молока, при этом защищая его от различных патогенных микроорганизмов. Благодаря этим бактериям происходит процесс квашения, который придает молочным продуктам характерный вкус и аромату. Использование молочнокислых бактерий в качестве закваски улучшает пищеварение и способствует укреплению иммунитета. Молочные продукты, обогащенные данными бактериями, являются важным источником пробиотиков, которые благотворно влияют на состояние микрофлоры кишечника и оказывают положительное воздействие на организм в целом.

Применение иммобилизованных молочнокислых бактерий является эффективным способом улучшения качества и срока хранения молочных продуктов. Иммобилизация бактерий позволяет увеличить их выход на поверхность продукта, что способствует улучшению вкусовых качеств и текстуры. Кроме того, данный метод обеспечивает более стабильное развитие молочнокислых бактерий в продукте, что способствует сохранению его полезных свойств. В результате использования иммобилизованных бактерий удается снизить риск развития патогенных микроорганизмов и улучшить общую безопасность продукта.

Степень сохранности иммобилизованных молочнокислых бактерий играет важную роль в продолжительности их жизнеспособности и эффективности применения в различных областях, таких как пищевая промышленность, медицина и сельское хозяйство. Она зависит от многих факторов, таких как тип иммобилизационной матрицы, метод фиксации бактерий, условия хранения и транспортировки. Для обеспечения высокой степени сохранности необходимо проводить тщательный контроль всех этапов процесса и поддерживать оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов. Важно также постоянно совершенствовать методы иммобилизации и разрабатывать новые технологии для повышения стабильности и долговечности иммобилизованных молочнокислых бактерий.

В статье [3] описывается исследование выживаемости молочнокислых микроорганизмов в составе эмульгированных мясных продуктов. В ходе исследования авторы выяснили, что на начальном этапе хранения происходит отмирание живых клеток лактобактерий, но затем их численность постепенно увеличивается за счет клетчатки, содержащейся в овсяных хлопьях и растительных компонентах.

Авторы [4] описали влияние иммобилизации *Bifidobacterium bifidum* в структуре альгинатных микрокапсул на жизнеспособность штамма в процессе воздействия смоделированных желудочно-кишечных жидкостей и хранения в кисломолочном напитке из овечьего молока. Рассмотрены влияние резистентного крахмала на процесс иммобилизации бифидобактерий, который в сочетании с альгинатом оказывает синергическое действие на гелеобразование, обеспечивая дополнительную защиту пробиотических клеток. Введение резистентного крахмала в структуру микрокапсул способствовало улучшению защиты и сохранению жизнеспособности микрокапсулированных бифидобактерий до 87 % от исходной концентрации при прохождении модельных сред, имитирующих процесс пищеварения человека.

В работе [8] исследованы приемы стабилизации клеток молочнокислых организмов (МКО). Выявлена высокая эффективность использования природных ассоциаций МКО, селективных по признаку длительного сохранения клетками МКО жизнеспособности и впервые показано, что дрожжевым компонентом стабильной ассоциации с молочнокислыми бактериями является *S. parapsilosis*.

Известен способ разработки защитной среды для сохранения активности кислотообразования молочнокислых бактерий. Защитная среда для хранения молочнокислых бактерий содержащая основу - обезжиренное молоко, источник азота, отличающаяся тем, что с целью обеспечения сохранения активности кислотообразования молочнокислых бактерий при хранении в лиофилизированном виде и удешевления среды, она дополнительно содержит кормовой витамин В12 и кальций углекислый, а в качестве источника азота и одновременно минеральных веществ - водный экстракт травяной муки с содержанием сухих веществ, общего от сухого вещества и золы от сухого вещества в определенном соотношении исходных компонентов [7].

Гаврилова и другие рассматривают методы защиты клеток пробиотических культур в неблагоприятных условиях сложных компонентных систем и желудочно-кишечного тракта. В качестве носителя для иммобилизации авторы использовали биополимеры натурального происхождения, а именно пектин цитрусовый и желатин. В результате исследований установлено, что иммобилизованные клетки микроорганизмов проявили устойчивость к исследуемым концентрациям тест-веществ, что может рассматриваться как косвенный показатель лучшей способности иммобилизованных клеток микроорганизмов приживаться в желудочно-кишечном тракте человека [5].

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – полностью экологический продукт. При этом отличается прочностью, гибкостью, низкой теплопроводностью и другими необыкновенными свойствами, которые могут привести к новым открытиям. БНЦ синтезируется различными бактериями и отличается от растительной целлюлозы структурными характеристиками [1-2].

БНЦ – это перспективный материал, который может использоваться в качестве носителя для иммобилизации молочнокислых бактерий. Иммобилизация бактерий на поверхности материала позволяет улучшить их выживаемость и функциональные свойства. БНЦ обладают высокой адсорбционной способностью, повышенной механической прочностью и биологической совместимостью, что делает их идеальным материалом для создания носителей для микроорганизмов. Таким образом, использование БНЦ в качестве носителя для иммобилизации молочнокислых бактерий может быть эффективным способом улучшить качество и функциональные характеристики кисломолочных продуктов.

Целью данной работы являлось исследование влияния на жизнедеятельность молочнокислых бактерий процесса их иммобилизации в структуре бактериальной наноцеллюлозы.

В качестве закваски использовали культуру ацидофильной палочки, которую предварительно активизировали на стерильном обезжиренном молоке при 40 °С в течение 8 часов. Количество клеток ацидофильной палочки в 1 мл закваски составило  $3 \cdot 10^8$  КОЕ. БНЦ получали статическим культивированием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* на полусинтетической питательной среде, состоящей из экстракта черного чая и глюкозы, при температуре 29 °С в течение 10 суток. Затем БНЦ отмывали 2%-ным раствором едкого натра с последующей промывкой 2%-ной соляной кислотой, и промывкой в дистиллированной воде до нейтральной реакции.

Далее готовили три варианта сорбции: в обезжиренное молоко вносили 3 % БНЦ, 5 % БНЦ и 10 % БНЦ. БНЦ предварительно размалывали. Затем проводили гомогенизацию образцов и стерилизацию их в автоклаве при 112 °С в течение 30 минут. В контрольный образец БНЦ не вносили. При этом было отмечено, что после автоклавирования образец с добавлением 10% БНЦ расслоился, образовался плотный сгусток, из которого выделялась прозрачная сыворотка (рис. 1). Возможно, БНЦ в процессе автоклавирования образует плотную пространственную сетку, в ячейках которой заключены белки молока.

В каждый из четырех образцов вносили исходную закваску в количестве 10 %, помещали в термостат при температуре 40 °С и выдерживали в течение 7 суток. В качестве контролируемых параметров были выбраны численность жизнеспособных клеток ацидофильной палочки

(определяли высевом на питательную среду гидролизованное молоко с агаром методом предельных разведений) и титруемая кислотность образцов (титрование пробы 0,1 Н раствором едкого натра). Изменение кислотности образцов в процессе культивирования представлено на рис. 2, изменение численности бактерий – в таблице 1.

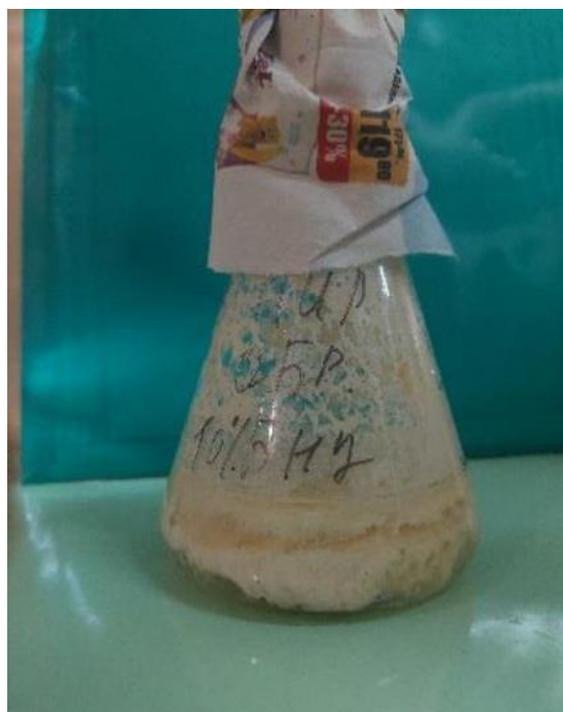


Рисунок 1. Образец обезжиренного молока с добавлением 10 % БНЦ после автоклавирования

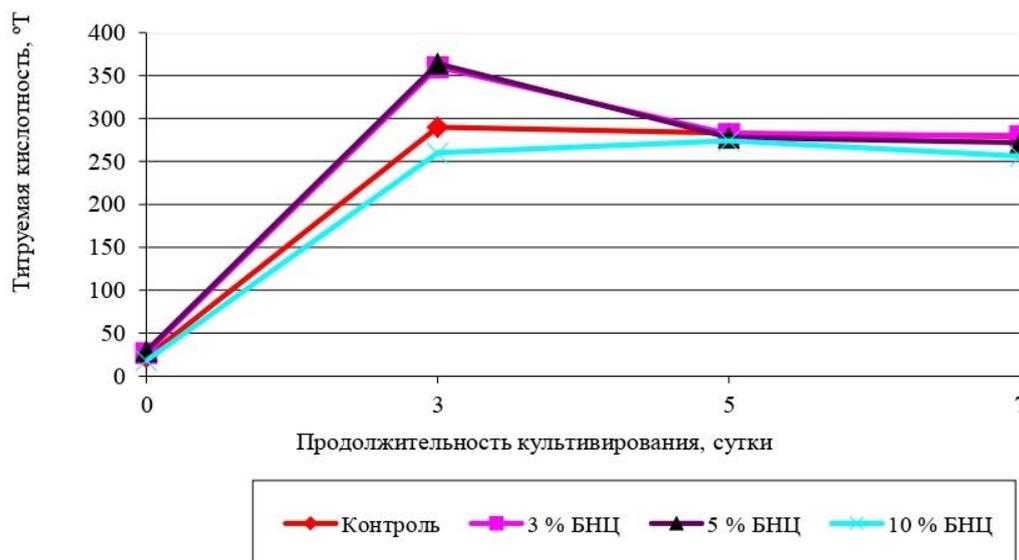


Рисунок 2. Динамика кислотности образцов в процессе культивирования

Можно отметить, что внесение 3 % и 5 % БНЦ способствует более активному росту кислотности, наибольшие значения наблюдаются на 3 сутки культивирования – 360 °Т и 364 °Т соответственно (против 290 °Т в контрольном образце). Далее кислотность во всех образцах начинает снижаться.

Таблица 1

## Динамика численности бактерий ацидофильной палочки

Продолжительность культивирования, сутки	Численность микроорганизмов, КОЕ/мл			
	контроль	3% БНЦ	5% БНЦ	10% БНЦ
0	$3 \cdot 10^7$			
3	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^7$
5	$2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	-
7	-	-	-	-

Что касается численности бактерий, то при внесении 3 % и 5 % БНЦ численность сохраняется на уровне контроля, при внесении 10 % БНЦ число клеток в образцах снижается существенно, возможно из-за структурной деформации образца.

Таким образом, суммируя полученные данные, можно сделать следующие выводы:

1. Внесение более 5 % БНЦ приводит к образованию сгустка уже на стадии стерилизации, поэтому следует либо вносить меньше этой дозировки, либо изменить способ внесения БНЦ.
2. Имобилизации бактерий ацидофильной палочки на БНЦ не влечет увеличения численности бактерий, но стимулирует их кислотообразование.
3. Культивирование более 3 суток нецелесообразно, т.к. и кислотность, и численность микроорганизмов по истечению этого времени начинают снижаться.

## Библиографический список

1. Gregory D.A., Tripathi L., Fricker A.T.R. et al. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications // Mater. Sci. Eng. R. 2021. V. 145. P. 100623. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>
2. Urbina L., Corcuera M.A., Gabilondo N. et al. A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields // Cellulose. 2021. V. 28. P. 8229. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04020-4>.
3. Бараненко Д.А., Борисова И.И., Борисов А.Е. Исследование выживаемости молочнокислых микроорганизмов в составе эмульгированных мясных продуктов. // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2016. № 3. С. 12-16. DOI: 10.17586/2310-1164-2016-9-3-12-16.
4. Вобликова Т.В. Жизнеспособность иммобилизованной микрокапсулированием культуры *Bifidobacterium bifidum* в кисломолочном напитке и смоделированных желудочно-кишечных жидкостях. // Вестник МГТУ. 2019. Т. 22, № 3. С. 305-313. DOI: 10.21443/1560-9278-2019-22-3-305-313.
5. Гаврилова Н.Б., Чернопольская Н.Л. Имобилизация клеток в гель биополимеров как метод защиты микроорганизмов. // Вестник Омского государственного аграрного университета. 2012. № 4 (8). С. 116-122.
6. Зарицкая В.В., Держапольская Ю.И. Микробиология молока и молочных продуктов: учебное пособие. Благовещенск: Изд-во Дальневосточного гос. аграрного ун-та, 2017. 89 с.
7. Защитная среда для хранения молочнокислых бактерий : а.с. 1413131 СССР. № 4005734/28-13; заявл. 03.01.86. ; опубл. 30.07.88, Бюл. 28. 8 с.
8. Николаев Ю.А., Шаненко Е.Ф., Эль-Регистан Г.И. Способы повышения жизнеспособности молочнокислых микроорганизмов. // Микробиология. 2019. Т. 88. № 5. С. 562-567. DOI: 10.1134/S0026365619050124.