

Príprava zmrazených a lyofilizovaných kultúr baktérií pre kvasenie zeleniny

RENÁTA RADOŠOVSKÁ - TOMÁŠ KUCHTA

Súhrn. Sledovalo sa prežívanie bakteriálnych kultúr pre kvasenie zeleniny (*Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus parvulus*) pri dlhodobom uskladnení v lyofilizovanej a zmrazenej forme. Osvedčila sa lyofilizácia v 10 % roztoku sušeného odtučneného mlieka. Pri zmrazovaní sa ako kryoprotektanty osvedčili 35 % sacharóza alebo 30 % betaín pre *L.pentosus* a 20 % glycerol alebo 30 % betaín pre *P.parvulus*.

V predchádzajúcej práci [1] bolo izolovaných niekoľko kmeňov baktérií z rodov *Lactobacillus* a *Pediococcus*, vhodných na kvasenie zeleniny. Vzhľadom na to, že pripravené čerstvé štartovacie kultúry pomerne rýchlo strácajú viabilitu, zamerala sa práca na spôsoby prípravy dlhodobo skladovateľných koncentrovaných kultúr. Na tento účel sa používa rozprašovacie sušenie, lyofilizácia a zmrazovanie [2,3]. Predbežné pokusy ukázali nízke prežívanie našich kultúr baktérií pri ich rozprašovacím sušení (B.Glončáková, osobné oznámenie), čo je v súlade so skúsenosťami iných [2,3]. Preto sa úsilie sústredilo na postupy zmrazovania a lyofilizácie.

Spoločným krokom oboch postupov je zmrazovanie. Je známe, že pri zmrazovaní živých buniek, resp. pri ich následnom rozmrazovaní, môže dôjsť k ireverzibilným zmenám v bunkových štruktúrach. Dôsledkom takéhoto poškodenia je smrť bunky resp. jej znížená metabolická aktivita po rozmrazení [4]. Do určitej miery možno poškodeniu zabrániť použitím vhodných kryoprotektantov. Pre bakteriálne kultúry sa najlepšie výsledky

Ing. Renáta Radošovská, RNDr. Tomáš Kuchta, CSc., Výskumný ústav potravinársky, pracovisko Modra, Štefánikova 45, 900 01 Modra.

dosiaľ dosiahli s glycerolom [5-7], sacharózou [6,8], laktózou [8], trehalózou [9], resp. zmrazovaním v mlieku [5,10].

Pri lyofilizácii sa bakteriálna biomasa suspenduje vo vhodnom roztoku, zmrazí a suší vo vákuu. Mieru prežívania baktérií, ktorá je inak nízka, možno zvýšiť použitím vhodných protektantov. Dobrý ochranný účinok pri lyofilizácii je známy pri 10 % roztoku sušeného odtučneného mlieka, prípadne doplnenom ďalšími protektantmi - želatínou [11], kyselinou askorbovou [12] alebo adonitolom [13].

Vychádzajúc zo spomenutých publikovaných údajov, zistených prevažne pre mliečne baktérie, optimalizovala sa príprava zmrazených a lyofilizovaných koncentrovaných kultúr baktérií na kvasenie zeleniny.

Materiál a metódy

Použili sa kmene *Lactobacillus pentosus* kal9w a *Pediococcus parvulus* kap3i [1], ktoré sa kultivovali v médiu MRS [14] pri 30°C za miešania 2 Hz do hustoty kultúry $A_{560} = 1,0$ až 1,2, ak nie je uvedené inak. Biomasa sa premyla 0,9 % roztokom NaCl a suspendovala v sterilných roztokoch protektantov. Ako protektanty sa použili: glycerol (Serva), sacharóza (Lachema), betaín (Sigma), adonitol (Sigma), trehalóza (Sigma), Sunar a odtučnené sušené mlieko (Promil).

Pre lyofilizáciu sa suspenzie kultúr plnili po 0,5 ml do sklenených lyofilizačných skúmaviek a zmrazili v etanolovom kryostate pri -30°C. Lyofilizovalo sa v lyofilizátore Leybold Lyovac GT2 počas 12 h. Po lyofilizácii boli vzorky evakuované a zatavené. Pred testovaním prežívania baktérií boli lyofilizáty rehydrované pôvodným množstvom pôdy MRS a inkubované 1 h pri 30°C.

Pre zmrazovanie sa suspenzie kultúr rozplnili po 1 ml do plastických skúmaviek a zmrazili v etanolovom kryostate pri -30°C. Vzorky sa skladovali v mrazničke pri -20°C a pred testovaním prežívania baktérií sa rozmrazili pri laboratórnej teplote.

Počet jednotiek, tvoriacich kolónie (CFU), sa určil po nariedení vzoriek 0,9 % roztokom NaCl a nanesení na platne MRS [14]. Platne sa kultivovali pri 30°C 24 h (kmene z rodu *Lactobacillus*) alebo 72 h (*Pediococcus*).

Výsledky a diskusia

So zámerom pripraviť koncentrované kultúry, ktoré by si uchovali životaschopnosť počas dlhej doby skladovania, lyofilizovali sa kultúry v roztokoch rôznych protektantov. Dobré výsledky sa dosiahli pri suspendovaní kultúr v 10 % roztoku sušeného odtučneného mlieka. Prežívanie baktérií *L.pentosus* kal9w pri jednotlivých krokoch lyofilizácie v tomto roztoku uvádza tab.1. Zmrazením a lyofilizáciou síce dochádza k úhynu 95 % baktérií, avšak pripravený lyofilizát je veľmi trvanlivý - počas 3 mesiacov skladovania pri 5°C alebo -20°C sa zachováva v lyofilizáte 100 % pôvodných živých baktérií. Podobné výsledky sa získali tiež s kmeňom *P.parvulus* kap3i i s inými kmeňmi z rodu *Lactobacillus* (podrobné výsledky sa neuvádzajú).

Tabuľka 1. Úbytok živých baktérií *L.pentosus* kal9w počas jednotlivých krokov lyofilizácie.

Table 1. Survival of *L.pentosus* kal9w during freeze-drying.

Pred zmrazením ¹	100 %
Po zmrazení ²	80 %
Po lyofilizácii ³	5 %
Po skladovaní 6 mes. pri 5°C ⁴	5 %

1 - Before freezing, 2 - after freezing, 3 - after drying, 4 - after 6-months storage at 5°C.

Menej výhodným ako sušené odtučnené mlieko sa ukázal Sunar. Lyofilizáty pripravené v roztokoch Sunaru boli ťažko rehydrovateľné, zrejme pre vyšší obsah tuku. Suspenzie baktérií v 1 mol.l⁻¹ a 2 mol.l⁻¹ glycerole, 1 mol.l⁻¹ a 2 mol.l⁻¹ sacharóze a v 1 mol.l⁻¹ a 2 mol.l⁻¹ betaíne sa ukázali ako nevhodné pre lyofilizáciu, keďže sa vzorky vždy skôr roztopili ako došlo k sublimácii vody.

Zvýšenie prežívania kultúr pri lyofilizácii prídavkom ďalších protektantov do mlieka nebolo úspešné. Prídavok 0,3 mol.l⁻¹ adonitolu, trehalózy, sacharózy ani betaínu však prežívanie nezvýšil (podrobné výsledky sa neuvádzajú).

Úbytok živých baktérií pri lyofilizácii závisel tiež od pomeru bakteriálnej biomasy a suspenďačného roztoku protektantu. Zistilo sa, že pre dostatočné prežívanie je potrebná hustota buniek aspoň 5.10⁹ ml⁻¹.

Na základe uvedených výsledkov sa odporúča pre dlhodobé uchovávanie kultúr baktérií na kvasenie zeleniny tento postup:

Baktérie sa kultivujú v pôde MRS do začiatku stacionárnej fázy, odstredia a premyjú 0,9 % roztokom NaCl. Biomasa sa suspenduje v sterilnom 10 % roztoku sušeného odtučeného mlieka v pomere 1 objemový diel biomasy ku 1 až 5 objemovým dielom roztoku. Suspenzie sa naplnia do lyofilizačných nádob, rýchlo zmrazia na -30°C a lyofilizujú. Lyofilizáty sa vákuovo uzavru a skladujú pri teplote 5°C alebo nižšej.

Lyofilizované kultúry na kvasenie zeleniny, pripravené týmto postupom, majú trvanlivosť porovnateľnú s publikovanými trvanlivosťami lyofilizovaných kultúr pre použitie v mliekárstve [11-13].

Kým kultúry lyofilizované v mlieku sú vhodné pre dlhodobé skladovanie, pre praktické použitie je obsah sušeného mlieka nevhodný, pretože pri priamom použití do nálevov šalátov by sa prejavil nežiadúcim zákalom. Pre tento účel sa preto vyskúšala príprava zmrazených kultúr. Prežívanie kultúr *L.pentosus* kal9w a *P.parvulus* kap3i pri zmrazovaní a skladovaní pri použití rôznych kryoprotektantov uvádzajú tabuľky 2. a 3. Ukázalo sa, že pre zmrazovanie kultúr *L.pentosus* kal9w je vhodné použitie 35 % roztoku sacharózy, alebo 15 % a 30 % roztoku betaínu. Podobné výsledky sa dosiahli tiež s inými kmeňmi z rodu *Lactobacillus* (podrobné výsledky sa neuvádzajú). Na kryoprotekciu kultúr *P.parvulus* kap3i sa ukázal vhodný 20 % roztok glycerolu a 30 % roztok betaínu.

Tabuľka 2. Prežívanie kultúr *L.pentosus* kal9w pri zmrazovaní v roztokoch rôznych kryoprotektantov.

Table 2. Effect of cryoprotective agents on survival of *L.pentosus* kal9w in frozen cultures.

Doba skladovania ¹	Hustota [CFU/ml]					
	Glycerol ²		Sacharóza ³		Betaín ⁴	
	10 %	20 %	35 %	50 %	15 %	30 %
0	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³
1 mesiac ⁵	2,6.10 ¹²	2,9.10 ¹²	3,0.10 ¹¹	2,2.10 ¹²	1,0.10 ¹³	4,0.10 ¹³
2 mesiace ⁵	4,1.10 ⁸	3,7.10 ⁶	8,0.10 ⁹	1,0.10 ¹⁰	1,5.10 ¹²	3,3.10 ¹²
6 mesiacov ⁵	5,6.10 ⁷	1,4.10 ⁶	1,5.10 ⁸	2,0.10 ⁶	6,3.10 ⁷	1,1.10 ¹⁰
12 mesiacov	0	0	7,9.10 ⁴	0	1,9.10 ⁶	5,7.10 ⁹

1 - Storage duration, 2 - glycerol, 3 - sucrose, 4 - betaine, 5 - month(s).

Tabuľka 3. Prežívanie kultúr *P.parvulus* kap3i pri zmrazovaní v roztokoch rôznych kryoprotektantov.

Table 3. Effect of cryoprotective agents on survival of *P.parvulus* kap3i in frozen cultures.

Doba skladovania ¹	Hustota [CFU/ml]					
	Glycerol ²		Sacharóza ³		Betaín ⁴	
	10 %	20 %	35 %	50 %	15 %	30 %
0	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$
1 mesiac ⁵	$2,7 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$
2 mesiace ⁵	$1,1 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^4$	$8,0 \cdot 10^5$
6 mesiacov ⁵	0	$2,8 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^3$	0	$3,2 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^4$
12 mesiacov	0	$8,4 \cdot 10^2$	0	0	0	$6,8 \cdot 10^2$

1 - Storage duration, 2 - glycerol, 3 - sucrose, 4 - betaine, 5 - month(s).

Suspenzie baktérií v týchto roztokoch boli odolné voči 1- až 2-násobnému rozmrazeniu a opätovnému zmrazeniu. Viacnásobné rozmrazenie a opätovné zmrazenie malo negatívny účinok na počet prežívajúcich baktérií (podrobné údaje sa neuvádzajú).

Úbytok živých baktérií pri zmrazovaní závisel tiež od veku kultúry. Ukázalo sa, že najlepšie prežívajú kultúry z konca exponenciálnej, resp. začiatku stacionárnej fázy (A_{560} 0,8 až 1,2; podrobné údaje sa neuvádzajú).

Na základe uvedených výsledkov sa odporúča pripravovať zmrazené koncentrované kultúry na kvasenie zeleniny týmto postupom:

Baktérie kultivovať v pôde MRS do začiatku stacionárnej fázy, odstrediť a premyť 0,9 % roztokom NaCl. Biomasu suspendovať v sterilnom roztoku kryoprotektantu v pomere 1 objemový diel biomasy k 1 objemovému dielu roztoku. Ako kryoprotektant použiť pre kmene z rodu *Lactobacillus* sacharózu alebo betaín a pre kmene z rodu *Pediococcus* glycerol alebo betaín. Suspenzie naplniť do zmrazovacích nádob, rýchlo zmraziť na -30°C a uskladniť pri -20°C .

Takto pripravené zmrazené kultúry majú trvanlivosť porovnateľnú s publikovanými trvanlivosťami zmrazených kultúr pre použitie v mliekárstve [6-8].

Literatúra

1. KUČHTA, T. - POLÍVKA, L.: Bulletin PV, 32, 1993, č.3-4, s.247-256.
2. FOSTER, E.M.: J. Dairy Sci., 45, 1962, s.1290.
3. STADHOUDERS, J. - JANSEN, L.A. - HUP, G.: Neth. Milk Dairy J., 23, 1969, s.182.
4. MAZUR, P.: Cryobiology, 14, 1977, s.251.
5. VALLES, E. - MOCQUOT, G.: Lait, 48, 1968, s.631.
6. STADHOUDERS, J. - HUP, G. - JANSEN, L.A.: Neth. Milk Dairy J., 25, 1971, s.229.
7. EFSTATHIOU, J.D. - MCKAY, L.L. - MORRIS, H.A. - ZOTTOLA, E. A.: J. Milk Food Technol., 38, s.444.
8. CHAVARRI, F.J. - DE PAZ, M. - NUNEZ, M.: Biotechnol. Lett., 10, 1988, s.11.
9. DE ANTONI, G.L. - PÉREZ, P. - ABRAHAM, A. - ANÓN, M.C.: Cryobiology, 26, 1989, s.149.
10. MOSS, C.W. - SPECK, M.L.: Appl. Microbiol., 11, 1963, s.326.
11. DAMJANOVIC, V. - RADULOVIC, D.: Cryobiology, 4, 1967, s.30.
12. SINHA, R.N. - DUDANI, A.T. - RANGANATHAN, B.: J. Food Sci., 39, 1974, s.641.
13. DE VALDÉZ, G.F. - DE GIORI, G.S. - DE RUIZ HOLGADO, A.A.P. - OLIVER, G.: Appl. Environ. Microbiol., 45, 1983, s.302.
14. DE MAN, J.C. - ROGOSA, M. - SHARPE, M.E.: J. Appl. Bacteriol., 23, 1960, s.130.

Do redakcie došlo 18.8.1993.

Preparation of frozen and freeze-dried cultures of bacteria for vegetables fermentation

Summary

Preservation of bacterial starters for vegetables fermentation (*Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus parvulus*) was studied. Good results were achieved with freeze-drying using 10 % skimmed milk as protectant. When frozen cultures were being prepared, 35 % sucrose or 30 % betaine were efficient cryoprotective agents for *L.pentosus*, while 20 % glycerol or 30 % betaine were efficient with *P.parvulus*.