

НОВЫЙ ПОДХОД В СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ МЕТОДОЛОГИИ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИДА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОНСОРЦИУМАХ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ



A NEW APPROACH FOR IMPROVEMENT OF THE METHODOLOGY
TO IDENTIFY A TYPE OF INTERACTION OF LACTIC ACID BACTERIA
IN CONSORTIUMS OF DIFFERENT STAGES OF CULTIVATION

Кондратенко В.В.¹ – к.т.н., зам. директора по научной работе
Посокина Н.Е.¹ – к.т.н., зав. лабораторией

технологии консервирования,

Лялина О.Ю.¹ – ведущий научный сотрудник, аспирант

Грачева А.Ю.¹ – к.т.н., ведущий научный сотрудник

Захарова А.И.¹ – старший научный сотрудник

Терешонок В.И.² – к.с.-х.н., с.н.с. лабораторно-аналитического центра

Kondratenko V.V.,¹

Posokina N.E.,¹

Lyalina O.Yu.,¹

Gracheva A.Yu.,¹

Zakharova A.I.,¹

Tereshonok V.I.²

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования» 142703, Россия, Московская обл., г. Видное, ул. Школьная, д. 78
www.vniitek.ru, e-mail: vniikoptok@yandex.ru

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур» (ФГБНУ ВНИИССОК) 143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14
E-mail: vniissok@mail.ru

¹ FSBSI All-Russian Research Institute of Canning Technology 142703, Russia, Moscow region, Vidnoe, Shkolnaya St, 78
www.vniitek.ru

E-mail: vniikoptok@yandex.ru

² Federal State Budgetary Research Institution 'All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production'

143080, Russia, Moscow region, Odintsovo district, p. VNISSOK, Selectionnaya St, 14
E-mail: vniissok@mail.ru

Задачей исследований являлось изучение имеющихся подходов оценки типов взаимодействия отдельных монокультур в консорциумах. На сегодняшний день существующие подходы позволяют получить только качественные результаты (синергетическое, антагонистическое, аддитивное взаимодействие) в целом, без учёта его изменения в процессе культивирования. Поэтому разработка нового подхода количественного определения данного показателя в виде непрерывной функции, определяемой на всем периоде культивирования, является актуальной. В процессе исследования для анализа типов взаимодействия был выбран двухкомпонентный консорциум молочнокислых микроорганизмов, культивированный на разных питательных средах в рамках исследования направленного ферментирования овощной продукции. В результате был разработан оригинальный подход, основанный на сравнении скорости нарастания биомассы микроорганизмов с рассчитанной аддитивной кривой по результатам анализа динамики титра микроорганизмов-участников консорциума в монокультуре в процессе их культивирования. Данный подход представляет собой удобный инструмент выявления комплексной закономерности изменения типов взаимоотношения микроорганизмов в консорциуме в виде непрерывной функции, определённой в течение всего периода культивирования.

Ключевые слова: консорциум, монокультура, молочнокислые микроорганизмы, синергетическое, антагонистическое, аддитивное взаимодействие, функциональная зависимость.

Summary

Existing approaches for evaluation of types of interactions between individual monocultures in consortiums allow obtaining only qualitative results (synergistic, antagonistic, additive interaction) as a whole, without regarding to changes in the cultivation process. Therefore, the development of a new approach for the quantitative determination of this indicator as a continuous function defined during the all period of cultivation is in need. In the course of the research a two-component consortium of lactic acid microorganisms cultivated on different mediums according to directed fermentation process in vegetable products was chosen to analyze types of interaction. As a result, the an original approach that was based on comparison of grow speed of biomass of microorganisms with calculated additive curve determined by results of dynamic analysis of titre of microorganism participating in consortium in monoculture during their cultivation has been elaborated. This approach is a convenient tool to identify complex regularity in changes of types of microorganism interaction in consortium represented by continuous function defined during all cultivation period.

Keywords: consortium, monoculture, lactic acid bacteria, synergistic, antagonistic, additive interaction, functional dependence.

Введение

Одним из эффективных биотехнологических способов переработки плодовоовощного сырья является направленное ферментирование посредством культивирования нативной или заданной (искусственно вносимой) микрофлоры с целью достижения конечной продукцией заданных кондиций. Наиболее распространёнными видами микроорганизмов, используемыми для ферментации, являются молочнокислые бактерии [1].

Однако использование нативной (дикой) микрофлоры имеет ряд недостатков, одним из которых является непредсказуемость и, как следствие, плохая управляемость процессом, что неприемлемо для крупномасштабного производства [2].

Вместе с тем, использование целевых искусственно вносимых монокультур не позволяет достичь требуемой интенсивности производства, а также негативно сказывается на органолептических показателях конечного продукта. Естественным решением данной проблемы является использование комплексных заквасок (консорциумов), включающих два и более конкурирующих целевых вида микроорганизмов [3]. Использование таких консорциумов позволяет снизить риск инфицирования среды бактериофагами [4], а также (теоретически) увеличить интенсивность технологического процесса и улучшить качество готовой продукции.

Подбор культурального состава консорциума является достаточно сложной задачей, ввиду того, что в процессе культивирования разные виды микроорганизмов могут вступать друг с другом в один из трёх типов взаимодействия: синергетическое – взаимное усиление зависимого положительного фактора, учитываемого в процессе культивирования; антагонистическое – взаимное ослабление зависимого положительного фактора; аддитивное – взаимодействие, при котором консорциум ведёт себя таким образом, как будто каждая из входящих из него культур культивируется без взаимодействия друг с другом.

Существующие подходы оценки типов взаимодействия отдельных монокультур в консорциумах позволяют получить только качественные результаты (синергетическое, антагонистическое, аддитивное взаимодействие) в целом, без учёта его изменения в процессе культивирования. Поэтому разработка нового подхода количественного определения данного показателя в виде непрерывной функции, определяемой на всем периоде культивирования, является актуальной.

Цели и задачи

Целью наших исследований являлось изучение и анализ существующих подходов оценки типов взаимодействия отдельных монокультур в консорциумах. Имеющиеся подходы позволяют получить только качественные результаты (синергетическое, антагонистическое, аддитивное взаимодействие) в целом, без учёта его изменения в процессе культивирования. В процессе исследований основная задача состояла в том, чтобы разработать новый подход количественного определения данного показателя в виде непрерывной функции, определяемой на всем периоде культивирования.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали микроорганизмы рода *Lactobacillus* видов *L. casei* и *L. brevis*, предоставленные ФГУП ГосНИИгенетика, и двухкомпонентный кон-

сорциум этих микроорганизмов. Как монокультуры, так и консорциум культивировали на двух модельных питательных средах. В качестве модельных сред использовали отличающиеся по химическому составу сорта белокачанной капусты «Слава» и «Парус» урожая 2015 года, предоставленные ФГБНУ «ВНИИС-СОК» [5].

Модельные среды представляли собой предварительно вымытую, нашинкованную, гомогенизированную биомассу капусты белокачанной заданного сорта с добавленной в неё поваренной солью в количестве 1,5% от массы сырья, расфасованную в стеклянные банки объёмом 0,7 дм³ с винтовой укупоркой, стерилизованную в течение 20 мин при противодавлении 1 бар с последующим охлаждением до комнатной температуры [6].

Регенерацию культуры проводили по следующей схеме: посев культуры, находящейся на хранении, в жидкую питательную среду MRS; термостатирование при температуре 30°C в течение 72 ч; определение начального титра культуры. Культивирование монокультур в модельных средах проводили путём их введения в продукт из расчёта 1% инокулята от объёма среды. Культивирование консорциумов проводили аналогично культивированию монокультур за исключением внесения в модельные среды суспензии из двух микроорганизмов в равных долях [5].

Активную фазу ферментирования осуществляли в течение 3-х суток при температуре +23...25°C, далее весь остальной период ферментирования образцы выдерживали при температуре -1...+4°C. Определение скорости культивирования микроорганизмов проводили путём выборочного контроля титра в модельной среде в 0-1-3-10-30-60-90 сутки культивирования. Получение экспериментальных данных проводили путём количественного определения титра молочнокислых микроорганизмов в различных стадиях культивирования монокультур, а также консорциума [7].

Обработку результатов микробиологических исследований проводили в несколько этапов: 1) проведение первичной статистической обработки экспериментальных данных (Microsoft Excel, Statistica); 2) определение функций, адекватно аппроксимирующих экспериментальные данные (SYSTAT TableCurve 2D); 3) аналитический расчёт функций скоростей нарастания микробальной биомассы в процессе ферментации для монокультур и консорциумов; 4) аналитический расчёт аддитивных функций скоростей нарастания микробальной микрофлоры для консорциумов; 5) аналитический расчёт показателей взаимодействия монокультур в консорциумах в процессе культивирования.

Результаты

Анализ экспериментальных данных показал, что функциональная зависимость, наиболее адекватно аппроксимирующая экспериментальные данные для всех вариантов исследования, имеет вид:

$$T(\tau) = e^{(a+c\tau+f\tau^2)/(1+b\tau+d\tau^2)} \quad (1)$$

где a – константа; b , c , d и f – коэффициенты; e – основание натурального логарифма; τ – продолжительность культивирования.

Данные по аппроксимирующим функциям для каждого варианта исследований представлены в таблице 1.

1. Данные по аппроксимирующим функциям динамики нарастания биомассы по вариантам исследований

Сорт белокочанной капусты (модельная среда)	Культура	Коэффициенты			
		a	b	d	f
«Слава»	<i>L. casei</i>	11,35172283	-0,01735148	0,001203008	0
	<i>L. brevis</i>	8,790283045	0,084495727	0,002891395	0,045861847
	Consortium	7,707946797	0,206618785	0,022617416	0,416581335
«Парус»	<i>L. casei</i>	9,539627421	0,614537242	17,01773355	0
	<i>L. brevis</i>	9,242715508	-0,04488842	0,757819228	0,043243815
	Consortium	9,831685697	0,290430254	9,248749128	0

Кривые нарастания микрофлоры представлены на рисунке 1.

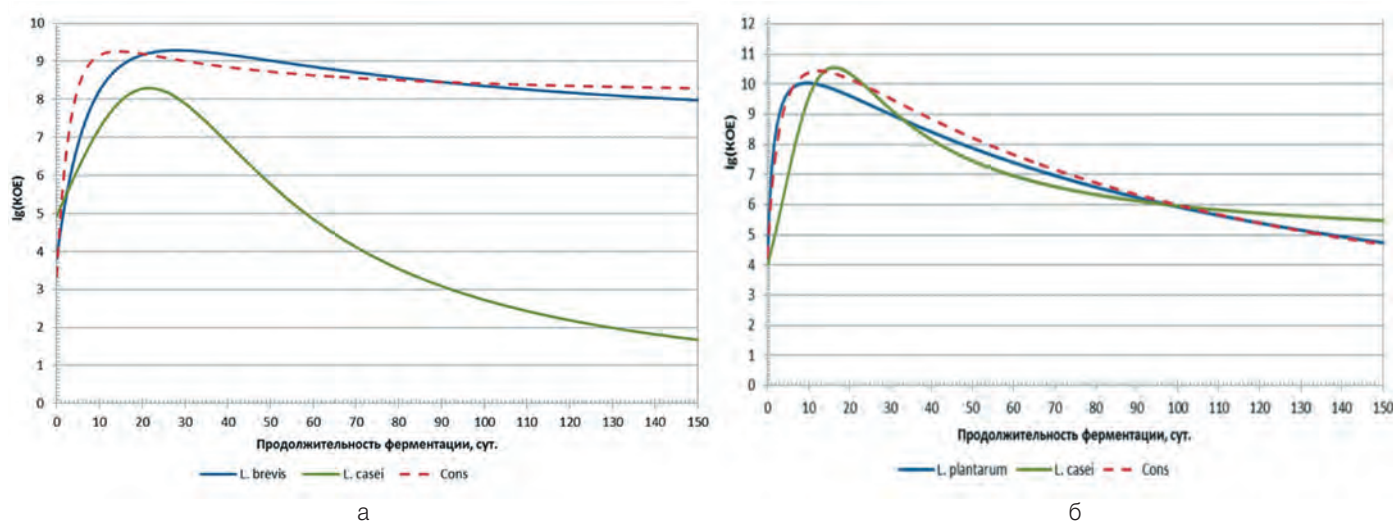


Рис. 1. Динамика нарастания монокультур *L. brevis* и *L. casei* на модельных средах на основе капусты белокочанной сортов «Слава» (а) и «Парус» (б)

Анализ экспериментальных данных показывает, что в зависимости от вида сырья одни и те же виды микроорганизмов проявляют различную динамику нарастания. Также предварительно можно судить о том, что вид сырья оказывает влияние на взаимодействие между видами микроорганизмов в консорциуме. Так при культивировании на модельной среде на основе капусты белокочанной сорта «Слава», максимальный титр консорциума достигался раньше, чем максимум титра отдельно входящих в него микроорганизмов. При культивировании этих же микроорганизмов в модельной среде на основе капусты сорта «Парус» такого вывода сделать не представляется возможным. В связи с этим в качестве первого шага к определению типов взаимодействия определяли скорости нарастания титра в виде функции

$$v(\tau) = T'(\tau), \quad (2)$$

где $v(\tau)$ – скорость нарастания титра в 1 г модельной среды, КОЕ/сут; $T'(\tau)$ – первая производная функциональной зависимости титра от продолжительности культивирования, КОЕ/сут.

Кривые полученных функций имели две выраженные зоны: первая, – для которой $v(\tau) \geq 0$, и вторая, для которой $v(\tau) < 0$. Для удобства представления логики дальнейших рассуждений, кривые (функции) были преобразованы следующим образом:

$$V(\tau) = \begin{cases} v(\tau), & v(\tau) \geq 0 \\ -v(\tau), & v(\tau) < 0 \end{cases} \quad (3)$$

Для получения представления о типах взаимодействия между микроорганизмами в консорциуме необходимо в каждый момент культивации сравнить кривую скорости нарастания титра с расчётной кривой, соответствующей скорости нарастания титра в консорциуме при аддитивном взаимоотношении между видами микроорганизмов, которая может быть рассчитана по формуле:

$$v_{add} = \frac{\sum_{i=1}^n v_i(\tau) \cdot T_i(\tau) \cdot q_i}{\sum_{i=1}^n T_i(\tau) \cdot q_i}, \quad (4)$$

д л я

которой примем, что

$$q_i = \frac{T_i^{cons}(0)}{T_i(0)}, \quad (5)$$

и, в свою очередь,

$$T_i^{cons}(0) = \frac{T^{cons}(0)}{n}, \quad (6)$$

где $T_i^{cons}(0)$ – титр i -й культуры в консорциуме при $\tau=0$, КОЕ/г; $T^{cons}(0)$ – титр консорциума при $\tau=0$, КОЕ/г; n – количество мик-

поорганизмов в консорциуме, q_i – пересчётный коэффициент. $Ti(0)$ – титр i -й культуры при $\tau = 0$ при её культивировании в монокультуре, КОЕ/г; v_{add} – аддитивная скорость нарастания титра в консорциуме, КОЕ/сут; $v_i(\tau)$ – скорость нарастания титра i -й культуры в монокультуре, КОЕ/сут; $Ti(\tau)$ – титр i -й культуры при её культивировании в монокультуре, КОЕ/г.

Поскольку $v_{add}(\tau)$ может принимать на разных этапах как положительные, так и отрицательные значения, для удобства представления дальнейшей логики рассуждений, формула была преобразована по аналогии с формулой (3).

Расчётные кривые, преобразованные в соответствии с формулой (2), представлены на рисунке 2.

Анализ расчётных данных показывает, что возможны 4 варианта развития событий: первый вариант – $v_{add}(\tau) < 0$ и $v_{эсп}(\tau) < 0$; второй вариант – $v_{add} < 0$ и $v_{эсп}(\tau) \geq 0$; третий вариант – $v_{add}(\tau) > 0$ и $v_{эсп}(\tau) > 0$; четвёртый вариант – $v_{add}(\tau) \geq 0$ и $v_{эсп}(\tau) < 0$.

Расчётные кривые показателей взаимодействия по исследованному консорциуму представлены на рисунке 3. На каждом из этих рисунков можно различить три зоны.

Первая зона – вид взаимодействия при обоюдном нарастании титра, вторая зона – вид взаимодействия при разновекторности скоростей нарастания титра консорциума и расчётного титра аддитивного взаимодействия, третья зона – вид взаимодействия при обоюдной убывающей скорости.

В зависимости от целей, стоящих перед культивированием, анализируется либо весь период культивирования, либо один или несколько его отдельных зон с расчётом соответствующих границ, что легко можно сделать графически, аналитически или численными методами в зависимости от требуемой точности.

Например, динамики показателя взаимодействия в процессе культивирования исследованных консорциума одних и тех же микроорганизмов на разных модельных средах фактически зер-

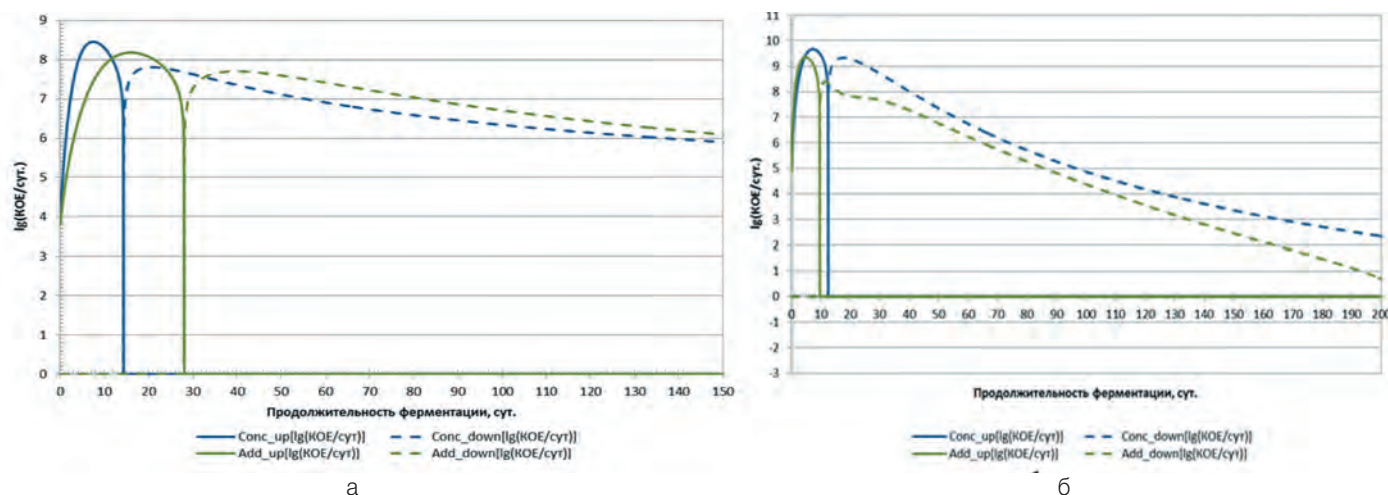


Рис. 2. Экспериментальные и аддитивные динамики скоростей нарастания (сплошная линия) и убывания (пунктирная линия) титра консорциума *L. brevis* и *L. casei* на модельных средах на основе белокачанной капусты сортов «Слава» (а) и «Парус» (б)

Для оценки типов взаимодействия предлагаем ввести показатель взаимодействия микроорганизмов в консорциуме, который для каждого из перечисленных случаев рассчитывается отдельным образом.

$$k(\tau) = \begin{cases} \lg\left(\frac{v_{exp}(\tau)}{v_{add}(\tau)}\right), & |v_{add}(\tau) \geq 0 \text{ и } v_{exp}(\tau) \geq 0 \\ \lg\left(\frac{v_{add}(\tau)}{v_{exp}(\tau)}\right), & |v_{add}(\tau) < 0 \text{ и } v_{exp}(\tau) < 0 \\ \lg(|v_{add}(\tau)| \cdot v_{exp}(\tau)), & |v_{add}(\tau) < 0 \text{ и } v_{exp}(\tau) \geq 0 \\ \lg\left(\frac{1}{v_{add}(\tau) \cdot |v_{exp}(\tau)|}\right), & |v_{add}(\tau) \geq 0 \text{ и } v_{exp}(\tau) < 0 \end{cases} \quad (7)$$

Следует отметить, что по своей природе данный показатель принимает значение больше нуля, если взаимодействие синергическое, меньше нуля, если антагонистическое, и становится равно нулю при аддитивном.

кальны друг другу по отношению к оси x и отличаются нюансами в каждой из описанных выше зон. Так в первой зоне процесс культивирования на модельной среде на основе капусты белокачанной сорта «Парус» провоцировал усиление антагонизма между микроорганизмами до 2-3 суток культивирования. При этом антагонизм сходит на нет на 5-е сутки, после чего почти линейно возрастает синергетическое взаимодействие. При культивировании на капусте сорта «Слава», наоборот, до 3 суток культивирования идёт нарастание синергизма взаимодействия, после чего до 12 суток культивирования синергетическое взаимодействие линейно уменьшается.

Выводы

Существующие подходы оценки типа взаимодействия отдель-

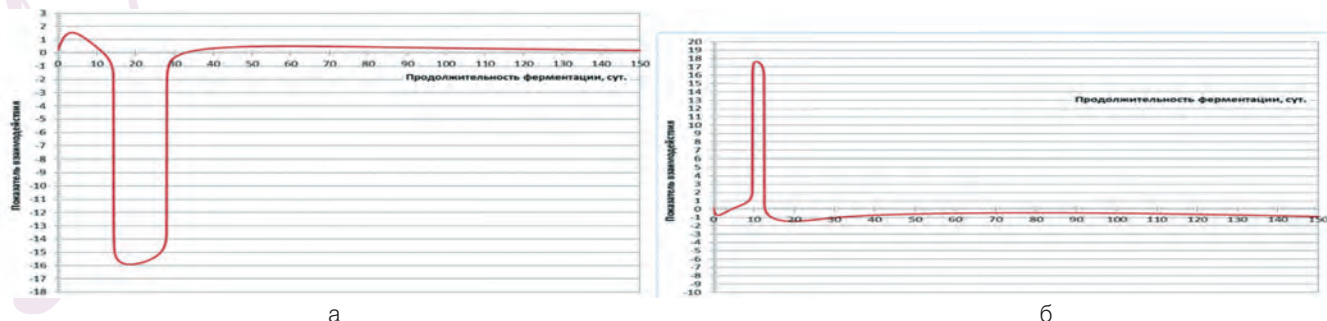


Рис.3. Динамика показателя взаимодействия консорциума *L. brevis* и *L. casei* на модельных средах на основе капусты белокачанной сортов «Слава» (а) и «Парус» (б)

ных монокультур в консорциуме позволяют получить только качественные результаты (синергетическое, антагонистическое, аддитивное взаимодействие) в целом без учёта его изменения в процессе культивирования. Поэтому разработка нового подхода количественного определения данного показателя в виде непрерывной функции, определяемой на всем периоде культивирования, является актуальной.

В результате аналитических и экспериментальных исследований был предложен оригинальный подход, основанный на сравнении скорости нарастания титра микроорганизмов с рассчитанной аддитивной кривой. Данный подход представляет собой сравнительно удобный инструмент выявления комплексной закономерности изменения типов взаимоотношения микроорганизмов в консорциуме в виде непрерывной функции, определяемой в течение всего периода культивирования. Предложенный подход является следующим этапом в анализе взаимодействия видов микроорганизмов в составе консорциума и является, по сути, совершенствованием существующей методологии.

Дальнейший более глубокий анализ полученных данных, подкреплённый результатами динамиками химического состава сырья, предположительно, позволит детализировано выявить причины подобного поведения микроорганизмов, являющегося, по сути суперпозицией конкуренции за пищевые ресурсы, факторы дыхания, ингибирования вегетативной и генеративной функции микроорганизмов.

Литература

1. Caplice E., Fitzgerald G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation // *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, 50, p. 131-149.
2. Holzapfel W.H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries // *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 75, p. 197-212.
3. Josephsen J., Jespersen L. Fermented foods and starter cultures // *Handbook of Food Science, Technology and Engineering* / Hui Y.H. (ed.). — Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. — P. 177-1 — 177-20.
4. Daly C. The use of mesophilic cultures in the dairy industry // *Antonie van Leeuwenhoek*, 1983, 49, p. 297-312.
5. Грачева А.Ю., Лялина О.Ю., Калинина Ж.А., Тырина Е.С., Посокина Н.Е. / Совершенствование методологии выявления вида взаимодействия молочнокислых микроорганизмов в консорциумах на разных этапах культивирования // Сборник научных трудов X Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук РАН «Современные подходы к получению и переработке сельскохозяйственной продукции – гарантия продовольственной независимости России». – Москва: ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова», 2016. С. 61-67.
6. Посокина Н.Е., Лялина О.Ю., Тырина Е.С. / Управляемое ферментирование как фактор формирования стабильного качества отдельных видов овощной продукции [Электронный ресурс] // Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции: сб. матер. III Всерос. научн.-практ. конф. молодых ученых и аспирантов (4-25 апреля 2016 г., г. Краснодар) – С. 1.-530. URL: http://vniiti.ru/conf/conf2016/sbornik_conf_2016.pdf.
7. ГОСТ 10444.11-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов».



С ЮБИЛЕЕМ!

Валентине Карловне Гинс – 75 лет!

В.К. Гинс – доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, действительный член Общероссийской общественной академии нетрадиционных и редких растений, лауреат Государственной премии и Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники в феврале текущего года отметила юбилейную дату. Ее исследовательская деятельность началась после окончания биолого-почвенного факультета МГУ им. М.В. Ломоносова в 1966 году в Институте фотосинтеза АН СССР, а после его реорганизации – в Институте фундаментальных проблем биологии РАН. В 1973 году Валентина Карловна защитила кандидатскую, а в 1991 году – докторскую диссертации в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. В 1997 году Валентина Карловна перешла на работу во ВНИИССОК заведующей лабораторией физиологии и биохимии растений. Ею внесен крупный вклад в исследования по фундаментальным проблемам фотосинтеза; в области биохимии белков, пигментов и биологически активных соединений; разработке физиолого-биохимических основ интродукции и биохимической селекции овощных культур с повышенным содержанием антиоксидантов, биологически активных веществ и их устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Эти разработки имеют высокую научную значимость и большое народнохозяйственное значение в решении проблемы здоровья нации и способствует экономической безопасности России. В.К. Гинс является автором более 300 научных трудов, 20 авторских свидетельств и патентов на изобретения, ею создано 20 сортов интродуцированных растений, а также получено 5 авторских свидетельств на создание новых сортов сельскохозяйственных культур.

Являясь заместителем председателя секции «Новые и нетрадиционные растения» РАСХН, В.К. Гинс организовала и провела одиннадцать Международных симпозиумов и двенадцать Международных научно-практических конференций, посвященных интродукции нетрадиционных и редких сельскохозяйственных растений, три Международных научно-методологических конференции «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции овощных, плодово-ягодных и лекарственных растений»; приняла активное участие в создании Общероссийской общественной организации «Общественная академия нетрадиционных и редких растений» (АНИПР).

Друзья, коллеги, ученики, редакция журнала «Овощи России» поздравляют Валентину Карловну с юбилеем и от души желают ей счастья, здоровья и новых достижений на благо развития отечественного овощеводства!