

## MIKROORGANIZMŲ KULTŪRŲ ATSPARUMO UŽŠALDYMO SĄLYGOMS PRIKLAUSOMYBĖ NUO TERPĖS SUDĖTIES IR LAIKYMO TEMPERATŪROS

Antanas Šarkinas

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; el. paštas: direktorius@lmai.lt

**Santrauka.** Vertinant apsauginės terpės sudėties ir laikymo temperatūros įtaką ląstelių gyvybingumui buvo tiriamos kultūros *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876). Paruošti apsauginės terpės variantai: atstatytas sausas liesas pienas su 20, 30 ir 40 procentų glicerino bei smegenų–širdies sultinys su 20, 30 ir 40 procentų glicerino. Bandytos minus 72°C ir minus 18°C temperatūroje.

Kultūroms saugoti tinkamesnė yra minus 72°C temperatūra, tačiau atskirų mikroorganizmų rūšių atsparumas laikymo sąlygoms nevienodas. Abiejose temperatūrose lieka daugiausia *S. typhimurium* gyvų ląstelių, tinkamos ir visų variantų terpės, tik minus 18°C temperatūroje daugiau ląstelių žūna smegenų–širdies sultinyje. *S. aureus* atsparumas saugojimo sąlygoms yra vidutinis. Blogiausiai išsilaiko *B. cereus*, kurių bandymo pabaigoje kartais lieka tik dalys procento. Ši kultūra išsiskiria ir ryškesniu žemesnės temperatūros poreikiu.

Pagal gautus rezultatus palankiau galima vertinti terpę lieso pieno pagrindu, glicerino koncentracija turi mažai įtakos.

Pienarūgščių bakterijų *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* kultūros išsilaikė geriau, jų gyvybingumą užtikrino abi laikymo temperatūros ir visi apsauginės terpės variantai.

Didesnį pienarūgščių bakterijų atsparumą saugant užšaldytas patvirtina ir ilgesnio eksperimento rezultatai. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* užšaldytos padermės atstatytame liesame piene su 10 proc. glicerino buvo saugomos minus 18°C temperatūroje trejus metus. 65 *Lactococcus lactis* padermės išlaikė gyvybingumą visą šį laiką. Ląstelių skaičius atšildytoje terpėje svyravo nuo dešimčių tūkstančių iki milijonų, daugeliu atvejų siekė šimtus tūkstančių ir daugiau. 79 proc. kultūrų išliko pakankamai aktyvios ir suraugino pieną per 18 val. Padermių aktyvumas atsistatė jau persodinus pirmą kartą, visas pienas surūgo per 18 val. Morfologinės savybės siek tiek svyravo, bet išliko būdingos – vyravo diplokokai. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* užšaldytos 55 padermės liko aktyvios, gyvų ląstelių skaičius svyravo nuo šimtų tūkstančių iki milijonų, tik dalies padermių sumažėjo iki dešimčių tūkstančių, bet ir jų aktyvumas atsistatė po pirmo persodinimo steriliame piene. Morfologinės savybės stabilios, mikroskopiniuose preparatuose vyravo diplokokai, buvo ilgesnių ir trumpesnių grandinelių, monokokų.

**Raktažodžiai:** pienarūgštės bakterijos, saugojimas, šaldymas, gyvybingumas.

## DEPENDENCY OF THE RESISTANCE OF MICROORGANISM CULTURES UNDER FROZEN STORAGE ON THE MEDIUM COMPOSITION AND STORAGE TEMPERATURE

Antanas Šarkinas

Food institute of Kaunas University of Technology, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas, Lithuania,  
E-mail: direktorius@lmai.lt

**Summary.** In assessing the impact of the protective medium composition and storage temperature on the vitality of cells, the cultures of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Bacillus cereus* (ATCC 10876) were studied. samples of protective medium were prepared, i.e. reconstituted dried skim milk with 20%, 30% and 40% glycerin and brain-heart infusion with 20%, 30% and 40% glycerin. The samples were tested at -18°C and -72°C.

It is more appropriate to store cultures at -72°C, however, the resistance of different microorganism species to storage conditions varies. At both temperatures major cells of *S. typhimurium* survive in all the media samples, only at -18°C more cells tend to die in the brain-heart infusion. The resistance of *S. aureus* to storage conditions is average. The resistance of *B. cereus* is the weakest: at the end of the experiment only percentiles of the culture remain in the samples. This culture is also characterized as requiring lower temperature conditions.

Results show that the skim milk based medium is more advantageous while the concentration of glycerin is less effective.

The resistance of lactic acid bacteria cultures (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, and *L. lactis*) was found to be better; the vitality of the cultures was ensured by both temperatures (-18°C and -72°C) in the different samples of protective medium.

A higher resistance of lactic acid bacteria under frozen storage has been proved by the results of a longer experiment. The strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* frozen in reconstituted skim milk with 10% of glycerin were stored at -18°C for three years. During this period 65 strains of *Lactococcus lactis* retained their vitality, the number of cells in the defrosted medium varied between ten thousands to

millions, reaching in most cases hundreds of thousands and even more. 79% of the cultures retained sufficient vitality and promoted milk fermentation within 18 hours. The activity of the strains restored immediately upon the first resowing and the entire milk fermented in 18 hours. The morphological characteristics (of the strains?) varied to a small extent retaining characteristic properties with the predominance of dyplococcus. The 55 frozen strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* remained active, the number of vital cells varying from hundreds thousands to millions; only that of few strains decreased to ten thousands, but even their activity restored upon the first resowing in a sterile milk. The morphological characteristics of strains were found to be stabile, with dyplococcus predominating in microscopic preparations and longer and shorter chains, monococos.

**Keywords:** lactic acid bacteria, frozen storage, vitality.

**Ivadas.** Pienarūgštes bakterijas naudojant pramonėje būtinas kultūrų aktyvumas ir jų savybių stabilumas prekiaujant, saugant ir naudojant preparatus, todėl nuolat tobulinama apsauginės terpės sudėtis, šaldymo, liofilizavimo, džiovavimo režimas. Liofilizuotų kultūrų gyvybingumas priklauso tiek nuo terpės sudėties, tiek ir nuo rehidracijos sąlygų (Carvalho et al., 2004). Atlikus tyrimus optimizuoti *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei*, *Microbacterium gubbeenense* liofilizavimo 5 proc. laktozės tirpale parametrai. Pavyko gauti sausą kultūrą, kurios aktyvumas sūrio brendimo metu nebuvo mažesnis už skystoje terpėje augintų kultūrų (Bockelmann et al., 2004). *Lactobacillus plantarum* maksimalų gyvybingumą išdžiovintuose bandiniuose galima užtikrinti kazeino priedais granulėse. Tyrimai atlikti vandens-glicerino sistemoje, iš pradžių laikant joje iki 50 min., vėliau – iki 30 min. vykstant džiovavimo procesui. Terpės  $a_w$  pakeitimas kazeino miltelių priedais pasiteisina. Esant  $a_w$  0,55 gyvybingumas siekia 70 proc, o esant  $a_w$  0,64 gyvybingumas – tik 2,1 proc. Šimtaprocentinį gyvybingumą pavyksta pasiekti, kai  $a_w$  <0,2 (Mille et al., 2004). Kultūros jogurto raugui, inkapsuliuotos kalcio alginate ar išrūgų baltymuose, buvo liofilizuotos, stebėtas jų gyvybingumas laikymo metu ir pačiame jogurte. Saugant geriau išlieka kalcio alginate inkapsuliuotos kultūros. Keturias savaites saugant 4°C temperatūroje jogurtą, liofilizuotų laisvų kultūrų skaičius sumažėjo 2,7–3,7 log., inkapsuliuotos kalcio alginate kultūros sumažėjo atitinkamai 1,7 ir 2,3 log. Inkapsuliuotos išrūgų baltymuose kultūros sumažėjo 2,0 ir 2,4 log. Liofilizuotos laisvos ląstelės gyvybingumą geriau išlaikė saugant 4°C temperatūros jogurte, nei minus 20°C temperatūroje (Kailasapahaty, Sureeta B.S., 2004). Liofilizacija antagonistines savybes gali sustiprinti (Oberauskas et al., 2004).

*Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* atsparumas šaldymui-atšildymui priklauso nuo augimo fazės, terpės, temperatūros. Užšaldyti geriausia stacionarinėje augimo fazėje. Plazmidžių tyrimai nepatvirtino jų įtakos atsparumui saugojimo sąlygoms (Lee Kibeom, 2004).

Tirta trijų kultivavimo temperatūrų – 30°C, 37°C, 42°C – ir trijų terpės pH – 4,5; 5,0; 6,0 įtaka gyvybingumui, užšaldžius pagal riebiųjų rūgščių kompoziciją. Krioatsparumas vertintas pagal rūgšties gamybos aktyvumą po užšaldymo ir laikymo minus 20°C temperatūroje. Augintos 30°C temperatūroje pH 5 terpėje ląstelės išliko aktyvios po užšaldymo, išlaikytų aktyvumas nežymiai sumažėja. Augintos 42°C temperatūroje esant pH 4,5, ląstelės buvo mažiausiai

atsparios šaldymui. Krioatsparumas susijęs su riebiųjų rūgščių santykiu membranose. Jei užšaldymui atsparumas didesnis, daugiau yra nesočiųjų rūgščių ir mažiau sočiųjų. Saugojimo metu geriau išlieka ląstelės, turinčios daugiau ciklinių C19:0 rūgščių. Mažiausias krioatsparumas nustatytas po kultivavimo esant pH 4,5 ir mažam C18:2 rūgščių kiekiui (Wang et al., 2005).

Tiriant žarnyno bifidobakterijų kultūrų ir probiotinių produktų atsparumą minus 135°C temperatūrai, nustatytas teigiamas sacharozės ir lieso pieno poveikis. Po užšaldymo lieka daugiau gyvų ląstelių nei po liofilizacijos (Modesto et al., 2004). Šaldant kai kuriuos produktus naudojamos apsauginės medžiagos – trehalozė, sorbitolis, natrio laktatas. Jų parinkimas turi įtakos ir pašalinės mikrofloros išlikimui saugojimo metu (Jittinindana et al., 2005).

Kultūroms saugoti dažniausiai buvo taikomi liofilizacijos ir užšaldymo metodai. Kadangi užšaldžius lieka daugiau gyvų ląstelių, mūsų tyrimo tikslas buvo išsaugoti pienarūgščių bakterijų kolekciją, parinkti pienarūgščių bakterijų užšaldymo sąlygas, sudarant palankios sudėties apsauginę terpę lieso pieno ir smegenų-širdies sultinio pagrindu, įvertinti laktokokų gyvybingumą po trejų metų laikymo minus 18°C temperatūroje.

**Tyrimų objektai ir metodai.** Darbas buvo atliekamas su KTU Maisto instituto Mikrobiologijos laboratorijoje saugoma pienarūgščių bakterijų ir kitų mikroorganizmų kolekcija, kultūras palaikant periodinių persodinių steriliame piene ir apsauginėje užšaldymo terpėje.

Užšaldant minus 18°C temperatūroje buvo naudojama apsauginė terpė iš atgaminto sauso pieno su 10 proc. glicerino. Šioje terpėje 10 ml talpos buteliukuose užšaldytos padermės ir jų mišiniai buvo laikyti nuo vienerių iki trejų metų. Atšildytos po trejų metų *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* kultūros buvo sėjamos į sterilų pieną, ribinių skiedimų metodu nustatomas gyvų ląstelių skaičius, vertinamas atgaivintų kultūrų aktyvumas, gyvybingumas pagal surūgimo laiką, grynumas bei morfologiniai požymiai mikroskopuojant. Tada pakartotinai buvo persodintos į sterilų pieną ir vėl užšaldytos minus 72°C temperatūros apsauginėje terpėje.

Vertinant apsauginės terpės sudėties ir laikymo temperatūros įtaką ląstelių gyvybingumui buvo tiriamos kultūros *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,

*Streptococcus thermophilus*. Paruošti apsauginės terpės variantai: atstatytas sausas liesas pienas su 20, 30 ir 40 proc. glicerino ir smegenų-širdies sultinys su 20, 30 ir 40 proc. glicerino. Kultūros 18 val. augintos optimalioje temperatūroje: *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* – ant nuožulnaus agarų, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* – steriliame piene. Kilpelė kultūros iš sterilaus pieno įdėta į 10 ml apsauginės terpės, gerai sumaišyta ir išpilstyta po 1 ml į 2 ml talpos plastikinius mėgintuvėlius. Kilpelė kultūros nuo nuožulnaus agarų išmaišyta skiediklyje, 1 ml suspensijos įpilta į 10 ml apsauginės terpės, gerai sumaišyta ir išpilstyta po 1 ml į 2 ml talpos plastikinius mėgintuvėlius. Nustačius pradinį ląstelių skaičių bandiniai lygiagrečiai užšaldyti minus 18°C ir minus 72°C temperatūroje. Išlikusių gyvų ląstelių, išlaikytų skirtingose terpėse ir temperatūrose, skaičius nustatytas po 5 mėnesių, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* sėjant

į lėkšteles, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* – į sterilų pieną.

**Rezultatai ir jų aptarimas.** Vertinant *S. aureus* atsparumą saugojimo sąlygoms nustatyta, kad ląstelių skaičius bandymo pradžioje buvo  $(4,3 \pm 1,5) \cdot 10^7$ , likusių gyvų ląstelių kiekis svyravo nuo 4 iki beveik 50 proc. Minus 18°C temperatūroje žuvo daugiau kultūros ląstelių, daugiau gyvų išliko minus 72°C temperatūroje (1 lentelė). Lygindami terpės sudėties įtaką matome, kad tiek liesas pienas, tiek ir smegenų-širdies sultinys užtikrina panašų gyvybingumą, palankiausias sąlygos – smegenų-širdies sultinyje su 30 proc. glicerino, kur minus 72°C temperatūroje lieka 48,83 proc. gyvų ląstelių. Minus 18°C temperatūroje šios terpės taip pat lieka daugiau kultūros ląstelių. Visų variantų terpėse bent keletą kartų daugiau gyvų ląstelių lieka saugant kultūras minus 72°C temperatūroje.

1 lentelė. *S. aureus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties

Eil. Nr.	Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius				
		Minus 18 °C		Minus 72 °C		–72 °C lyginant su –18 °C, kartai
		KSV/ml	Likutis nuo pradinio sk., proc.	KSV/ml	Likutis nuo pradinio sk., proc.	
1	Smegenų-širdies sultinys su 20% glicerino	$(3,7 \pm 3,5) \cdot 10^6$	4,4	$(7,8 \pm 3,5) \cdot 10^6$	18,0	2,1
2	Smegenų-širdies sultinys su 30% glicerino	$(8,0 \pm 3,5) \cdot 10^6$	18,6	$(2,1 \pm 3,5) \cdot 10^7$	48,83	2,62
3	Smegenų-širdies sultinys su 40% glicerino	$(2,8 \pm 3,5) \cdot 10^6$	6,51	$(1,6 \pm 3,5) \cdot 10^7$	37,2	5,7
4	Liesas pienas su 20% glicerino	$(3,0 \pm 3,5) \cdot 10^6$	6,97	$(1,7 \pm 3,5) \cdot 10^7$	39,53	5,66
5	Liesas pienas su 30% glicerino	$(2,1 \pm 3,5) \cdot 10^6$	4,88	$(1,4 \pm 3,5) \cdot 10^7$	32,56	6,66
6	Liesas pienas su 40% glicerino	$(6,2 \pm 3,5) \cdot 10^5$	14,41	$(1,7 \pm 3,5) \cdot 10^7$	39,53	27,41

2 lentelė. *B. cereus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties

Eil. Nr.	Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius				
		Minus 18 °C		Minus 72 °C		–72 °C lyginant su –18 °C, kartai
		KSV/ml	Likutis nuo pradinio sk., proc.	KSV/ml	Likutis nuo pradinio sk., proc.	
1	Smegenų-širdies sultinys su 20% glicerino	$(1,0 \pm 3,5) \cdot 10^3$	0,015	$(2,5 \pm 3,5) \cdot 10^5$	3,96	250
2	Smegenų-širdies sultinys su 30% glicerino	$(1,0 \pm 3,5) \cdot 10^2$	0,0015	$(5,3 \pm 3,5) \cdot 10^4$	0,84	530
3	Smegenų-širdies sultinys su 40% glicerino	$(5,0 \pm 3,5) \cdot 10^0$	0,0009	$(1,1 \pm 3,5) \cdot 10^5$	1,74	22000
4	Liesas pienas su 20% glicerino	$(6,6 \pm 3,5) \cdot 10^3$	0,11	$(6,5 \pm 3,5) \cdot 10^5$	10,32	98
5	Liesas pienas su 30% glicerino	$(3,0 \pm 3,5) \cdot 10^6$	47,61	$(5,5 \pm 3,5) \cdot 10^6$	87,30	1,8
6	Liesas pienas su 40% glicerino	$(6,1 \pm 3,5) \cdot 10^3$	0,096	$(8,4 \pm 3,5) \cdot 10^5$	13,33	137

Bandyta apsauginė terpė ir laikymo temperatūros mažiau palankios *B. cereus* gyvybingumui (2 lentelė).

Šios kultūros ląstelių skaičius bandymo pradžioje siekė  $(6,3 \pm 1,9) \cdot 10^6$ , bandymo metu sumažėjo iki kelių

tūkstančių kartų. Šiai kultūrai labiau tinka žemesnė temperatūra. Visų variantų terpėse nuo kelių iki kelių šimtų kartų daugiau gyvų ląstelių lieka saugant kultūras minus 72°C temperatūroje. *B. cereus* palankiausia terpė yra liesas pienas su 30 proc. glicerino, nes jame minus 18°C ir minus 72°C temperatūroje liko atitinkamai 46,71 ir 87,3 proc. gyvų ląstelių.

Atspariausios laikymo sąlygoms buvo *S. typhimurium* (3 lentelė). Gyvų ląstelių skaičius bandymo pradžioje

siekė  $(8,3 \pm 2,7) \cdot 10^7$ , bandymo pabaigoje liko nuo 40 iki 80 proc. Daugiau gyvų ląstelių išliko minus 72°C temperatūroje. *S. typhimurium* palankesnė ši temperatūra, tinkamesnis terpės pagrindas yra liesas pienas. Tai ypač pastebima minus 18°C temperatūroje, tačiau saugojimo temperatūros įtaka žymiai mažesnė, daugeliu atvejų ląstelių skaičius minus 72°C temperatūroje didesnis ne daugiau kaip du kartus. Taigi *S. typhimurium* labiausiai atspari šaldymui.

3 lentelė. *S. typhimurium* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties

Eil. Nr.	Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius				
		Minus 18 °C		Minus 72 °C		-72 °C lyginant su -18 °C, kartai.
		KSV/ml	Likutis nuo pradinio sk., proc.	KSV/ml	Likutis nuo pradinio sk., proc.	
1	Smegenų-širdies sultinys su 20% glicerino	$(3,3 \pm 3,5) \cdot 10^7$	39,75	$(7,0 \pm 3,5) \cdot 10^7$	84,33	2,12
2	Smegenų-širdies sultinys su 30% glicerino	$(3,7 \pm 3,5) \cdot 10^7$	44,57	$(6,5 \pm 3,5) \cdot 10^7$	78,31	1,75
3	Smegenų-širdies sultinys su 40% glicerino	$(5,8 \pm 3,5) \cdot 10^7$	69,87	$(6,0 \pm 3,5) \cdot 10^7$	72,29	1,03
4	Liesas pienas su 20% glicerino	$(6,7 \pm 3,5) \cdot 10^7$	80,72	$(6,4 \pm 3,5) \cdot 10^7$	77,10	0,95
5	Liesas pienas su 30% glicerino	$(6,1 \pm 3,5) \cdot 10^7$	73,49	$(1,9 \pm 3,5) \cdot 10^6$	83,13	1,13
6	Liesas pienas su 40% glicerino	$(5,7 \pm 3,5) \cdot 10^7$	68,67	$(6,8 \pm 3,5) \cdot 10^7$	81,92	1,19

4 lentelė. *S. thermophilus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties

Eil. Nr.	Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius	
		Minus 18 °C	Minus 72 °C
		KSV/ml	KSV/ml
1	Smegenų-širdies sultinys su 20% glicerino	$(7,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(1,0 \pm 3,4) \cdot 10^7$
2	Smegenų-širdies sultinys su 30% glicerino	$(4,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(3,0 \pm 1,3) \cdot 10^6$
3	Smegenų-širdies sultinys su 40% glicerino	$(9,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$
4	Liesas pienas su 20% glicerino	$(1,0 \pm 3,4) \cdot 10^6$	$(7,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$
5	Liesas pienas su 30% glicerino	$(3,0 \pm 1,3) \cdot 10^7$	$(7,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$
6	Liesas pienas su 40% glicerino	$(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^7$	$(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^7$

Ląstelių skaičius bandymo pradžioje –  $(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^7$

5 lentelė. *L. bulgaricus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties

Eil. Nr.	Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius	
		Minus 18 °C	Minus 72 °C
		KSV/ml	KSV/ml
1	Smegenų-širdies sultinys su 20% glicerino	$(7,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^6$
2	Smegenų-širdies sultinys su 30% glicerino	$(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^5$	$(9,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$
3	Smegenų-širdies sultinys su 40% glicerino	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(7,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$
4	Liesas pienas su 20% glicerino	$(4,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$
5	Liesas pienas su 30% glicerino	$(7,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^6$
6	Liesas pienas su 40% glicerino	$(7,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(9,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$

Ląstelių skaičius bandymo pradžioje –  $(9,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$

6 lentelė. *L. lactis* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties

Eil. Nr.	Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius	
		Minus 18 °C	Minus 72 °C
		KSV/ml	KSV/ml
1	Smegenų-širdies sultinys su 20% glicerino	$(1,0\pm 3,4)\cdot 10^7$	$(1,5\pm 0,5)\cdot 10^7$
2	Smegenų-širdies sultinys su 30% glicerino	$(9,0\pm 0,0)\cdot 10^6$	$(4,0\pm 0,0)\cdot 10^6$
3	Smegenų-širdies sultinys su 40% glicerino	$(6,6\pm 2,1)\cdot 10^6$	$(1,5\pm 0,5)\cdot 10^7$
4	Liesas pienas su 20% glicerino	$(4,0\pm 0,0)\cdot 10^7$	$(4,0\pm 0,0)\cdot 10^7$
5	Liesas pienas su 30% glicerino	$(1,0\pm 3,4)\cdot 10^7$	$(1,0\pm 0,3)\cdot 10^6$
6	Liesas pienas su 40% glicerino	$(6,6\pm 2,1)\cdot 10^6$	$(9,0\pm 0,0)\cdot 10^6$

Ląstelių skaičius bandymo pradžioje –  $(6,6\pm 2,1)\cdot 10^6$

Pienarūgštės bakterijos (4–6 lentelės) tiriamose apsauginėse terpėse išlieka gyvybingos, atsparios saugojimo sąlygoms. Laikant penkis mėnesius ląstelių skaičius beveik nepakinta. Taikytas ribinių praskiedimų metodas nėra tikslus, todėl sunku palyginti skirtingų terpių ir temperatūrų įtaką kultūrų gyvybingumui. Tačiau ir šis metodas pakankamai gerai iliustruoja *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* atsparumą laikymo sąlygoms. Ląstelių skaičius lieka pradinio lygio visų variantų terpėse. Vadinasi, terpės yra palankios saugoti, ir sudėties svyravimai įtakos nedarė. Negalima išskirti ir temperatūros poveikio, nes ląstelės lieka gyvos ir minus 18°C, ir minus 72°C temperatūroje. Vadinasi, pienarūgštės bakterijos išlieka atsparesnės, kai saugomos užšaldytos,

nei kitos tirtos bakterijos, tarp kurių atsparesnės yra *S. typhimurium*.

Didesnį pienarūgščių bakterijų atsparumą saugant užšaldžius patvirtina ir ilgesnio eksperimento rezultatai. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* užšaldytos padermės atstatytame liesame piene su 10 proc. glicerino buvo saugomos minus 18°C temperatūroje. Tyrimas truko trejus metus periodiškai įvertinant kultūrų gyvybingumą pagal gyvų ląstelių skaičių ir aktyvumą, surauginimo laiką, morfologines savybes. 7 lentelėje matome, kad 65 *Lactococcus lactis* padermės išliko gyvybingos visą šį laikotarpį, ląstelių skaičius svyravo nuo dešimčių tūkstančių iki milijonų, daugeliu atvejų siekė šimtus tūkstančių ir daugiau.

7 lentelė. *L. lactis* padermių, išlaikytų 3 metus minus 18°C temperatūroje, savybės atgaivinus

Eil. Nr.	Padermė	Surūgimo laikas po atgaivinimo	Gyvų ląstelių skaičius po atšildymo, 1ml	Mikroskopinis vaizdas po atgaivinimo	Surūg. laikas po pirmo persodinimo, val.
1	47/3	36	$10^5$	diplokokai	18
2	117/28	36	$10^4$	diplokokai, monokokai	18
3	141/22	18	$10^6$	diplokokai, monokokai	18
4	C128	18	$10^6$	diplokokai, monokokai	18
5	C791	18	$10^6$	diplokokai	18
6	142/23	18	$10^6$	diplokokai	18
7	140/3	24	$10^3$	diplokokai, trumpos grand.	18
8	C140/5	18	$10^7$	diplokokai, trumpos grand.	18
9	40/22	18	$10^6$	diplokokai, trumpos grand.	18
10	M601	18	$10^6$	diplokokai, trumpos grand.	18
11	21/2	18	$10^6$	diplokokai, monokokai	18
12	C140/21	24	$10^3$	diplokokai, monokokai	18
13	A147	36	$10^4$	diplokokai, trumpos grand.	18
14	C140/2	18	$10^3$	diplokokai, trumpos grand.	18
15	40/154	18	$10^6$	diplokokai, tr., ilgos grand.	18
16	M60II	18	$10^3$	diplokokai, trumpos grand.	18
17	40/58	18	$10^6$	diplokokai, trumpos grand.	18
18	C79	18	$10^6$	diplokok., monok. tr. grand.	18
19	2/55	18	$10^6$	diplokokai, trumpos grand.	18
20	17279	18	$10^6$	diplokokai, monokokai	18
21	11140/1	18	$10^6$	diplokokai, trumpos grand.	18
22	142/21	18	$10^6$	diplokokai	18

23	C132	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
24	B14	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, monokokai	18
25	A153	18	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
26	73/13	36	10 <sup>4</sup>	diplokokai	18
27	R264	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, yra monokokų	18
28	A50	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
29	67/84	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
30	A307	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
31	A234	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
32	73/23	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
33	17275	36	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
34	7/7	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., ilgos grand.	18
35	67/66	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
36	117/48	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
37	117/17	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
38	T219	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., ilgos grand.	18
39	40/1	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., ilgos grand.	18
40	Z259	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
41	N19	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
42	7261	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand	18
43	C127	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
44	C150 I	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
45	47/8	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
46	73/11	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
47	R27	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
48	R12	24	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
49	47/54	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, yra grandinėlis	18
50	Z276 I	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., ilgos grand.	18
51	Z252	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., ilgos grand.	18
52	40/13	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
53	Z215 I	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
54	40/118	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
55	Z264	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
56	67/110	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
57	A152	19	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
58	124/33	36	10 <sup>4</sup>	diplokokai	18
59	T215	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
60	141/4	36	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
61	R32	24	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
62	40/76	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
63	73/39	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
64	A145	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
65	C140/3	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., ilgos grand.	18

Tik septynios padermės, arba 10 proc., neraugino pieno per vieną parą. Rauginimo procesas užtruko iki 36 val. Tiek pat kultūrų suraugino pieną per parą, likusios 52, arba 79 proc., išliko pakankamai aktyvios ir suraugino pieną per 18 val. Padermių aktyvumas atsistatė jau persodinus pirmą kartą: visas pienas surūgo per 18 val. Morfologinės savybės šiek tiek svyravo, bet išliko būdingos – vyravo diplokokai, buvo ilgesnių ir trumpesnių grandinėlių, monokokų.

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* užšaldytos padermės atstatytame liesame piene su 10 proc. glicerino taip pat išliko gyvybingos (8 lentelė). Iš 55 padermių per parą pieno nesutraukė 5, 9 padermių pieno rūgimas užsitęsė iki paros. Likusios padermės pieną raugino ne

ilgiau kaip 18 val., taigi liko aktyvios, nes gyvų ląstelių skaičius svyravo nuo šimtų tūkstančių iki milijonų. Ir tik dalies padermių sumažėjo dešimtimis tūkstančių, bet ir jų aktyvumas atsistatė pirmą kartą persodinus steriliame piene. Morfologinės savybės išliko stabilios, mikroskopiniuose preparatuose vyravo diplokokai, buvo ilgesnių ir trumpesnių grandinėlių, monokokų.

**Aptarimas ir išvados.** Apibendrinant rezultatus galima teigti, kad kultūroms saugoti tinkamesnė yra minus 72°C temperatūra, tačiau atskirų mikroorganizmų rūšių atsparumas laikymo sąlygoms nevienodas. Abiejose temperatūrose lieka daugiausia *S. typhimurium* gyvų ląstelių, tinkamos ir visų variantų terpės, tik minus 18°C temperatūroje daugiau ląstelių žūva smegenų-širdies

sultinyje. *S. aureus* atsparumas saugojimo sąlygoms yra pabaigoje atskirų variantų lieka tik dalys procento. Ši vidutinis, blogiausiai išsilaiko *B. cereus*. Jų bandymo kultūra išsiskiria ir žemesnės temperatūros poreikiu.

8 lentelė. *L. cremoris* padermių, išlaikytų 3 metus minus 18°C temperatūroje, savybės po atgaivinimo

Eil. Nr.	Padermė	Surūgimo laikas po atgaivinimo	Gyvų ląstelių skaičius po atšildymo, lml	Mikroskopinis vaizdas po atgaivinimo	Surūg. laikas po pirmo persodinimo, val.
1	25/53	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
2	73/16	36	10 <sup>4</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grand.	18
3	90/2	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
4	40/36	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
5	T18/9	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
6	67/95	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, yra grand.	18
7	R260/8	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., ilgos grand.	18
8	88/9 I	18	10 <sup>5</sup>	įvairaus ilgio grand.	18
9	T206/10	18	10 <sup>5</sup>		18
10	88/234	18	10 <sup>6</sup>	įvairaus ilgio grandinėlės	18
11	Cr1/10 I	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
12	88/9	18	10 <sup>5</sup>	įvairaus ilgio grandinėlės	18
13	73/44	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grand.	18
14	24/143	18	10 <sup>5</sup>	įvairaus ilgio grandinėlės	18
15	40/60	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
16	73/50	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grand.	18
17	2/54	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
18	40/5	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
19	41/40	20	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
20	88/218	18	10 <sup>6</sup>	įvairaus ilgio grand.	18
21	40/239	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
22	73/64	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
23	40/7	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
24	K87 II	36	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	24
25	67/116	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
26	61/71	18	10 <sup>6</sup>	įvairaus ilgio grand.	18
27	73/38	36	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
28	R260 I	36	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
29	88/206	18	10 <sup>6</sup>	įvairaus ilgio grand.	18
30	40/87	36	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
31	T221	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
32	T18	20	10 <sup>5</sup>	įvairaus ilgio grand.	18
33	17/6	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
34	40/103	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
35	73/5	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
36	67/96	24	10 <sup>4</sup>	diplokokai, trumpos grand.	24
37	Fd8/7	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
38	73/48	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
39	73/1	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai	18
40	40/105	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
41	73/22	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grand.	18
42	A2 V	24	10 <sup>4</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
43	88/214	18	10 <sup>6</sup>	įvairaus ilgio grand.	18
44	40/59	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
45	K17/2	18	10 <sup>5</sup>	įvairaus ilgio grand.	18
46	90/35	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
47	40/51	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
48	88/226	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai	18
49	67/114	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
50	73/67	18	10 <sup>6</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
51	40/61	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, trumpos grand.	18
52	47/15	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
53	25/57	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
54	67/56	18	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18
55	40/53	24	10 <sup>5</sup>	diplokokai, tr., vid. ilgio grandinėlės	18

Pagal gautus rezultatus sunkiau išskirti tinkamesnį terpės pagrindą. Šiek tiek palankiau galima vertinti terpę lieso pieno pagrindu. Sunku išskirti ir tinkamiausią glicerino koncentraciją.

Pienarūgščių bakterijų *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* kultūros išsilaikė geriau, jų gyvybingumą užtikrino abi laikymo temperatūros ir visų variantų apsauginės terpės. Jų kiekiui nustatyti taikyta tikėtiniausio skaičiaus metodika yra mažiau tiksli. Sunku daryti išvadas, tačiau galima pastebėti, kad ląstelių skaičius liko pradinio lygio.

Didesnį pienarūgščių bakterijų atsparumą saugant užšaldžius patvirtina ir ilgesnio eksperimento rezultatai. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* užšaldytos padermės atstatytame liesame piene su 10 proc. glicerino buvo saugomos minus 18°C temperatūroje trejus metus. 65 *Lactococcus lactis* padermės buvo gyvybingos visą šį laikotarpį, ląstelių skaičius atšildytoje terpėje svyravo nuo dešimčių tūkstančių iki milijonų, daugeliu atvejų siekė šimtus tūkstančių ir daugiau. 79 proc. kultūrų išliko pakankamai aktyvios ir pieną suraugino per 18 val. Padermių aktyvumas atsistatė jau po pirmo persodinimo, visas pienas surūgo per 18 val. Morfologinės savybės šiek tiek svyravo, bet išliko būdingos – vyravo diplokokai. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* užšaldytos padermės liko aktyvios, nes gyvų ląstelių skaičius svyravo nuo šimtų tūkstančių iki milijonų, ir tik dalies padermių sumažėjo dešimtimis tūkstančių, bet ir jų aktyvumas atsistatė pirmą kartą persodinus steriliame piene. Morfologinės savybės buvo stabilios, mikroskopiniuose preparatuose vyravo diplokokai, buvo ilgesnių ir trumpesnių grandinelių, monokokų.

#### Išvados:

1. Kultūroms saugoti tinkamesnė yra minus 72°C temperatūra, tačiau atskirų mikroorganizmų rūšių atsparumas laikymo sąlygoms nevienodas. Abiejose temperatūrose daugiausia lieka *S. typhimurium* gyvų ląstelių, jai tinka ir visų variantų terpės. Tik *S. aureus* atsparumas saugojimo sąlygoms yra vidutinis. Blogiausiai išsilaikė *B. cereus*, kurių bandymo pabaigoje atskirais variantais lieka tik dalys procento. Ši kultūra ryškiai išsiskiria ir žemesnės temperatūros poreikiu.

2. Pienarūgščių bakterijų *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* kultūros išsilaikė geriau, jų gyvybingumą užtikrino abi laikymo temperatūros ir visų variantų apsauginės terpės.

3. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* užšaldytos padermės atstatytame liesame piene su 10 proc. glicerino minus 18°C temperatūroje gyvybingumą išlaikė trejus metus. Ląstelių skaičius atšildytoje terpėje svyravo nuo dešimčių tūkstančių iki milijonų, daugeliu atvejų siekė šimtus tūkstančių ir daugiau. 79 proc. kultūrų išlaikė pakankamą aktyvumą ir suraugino pieną per 18 val. Padermių aktyvumas atsistatė jau persodinus pirmą kartą.

**Padėka. Autoriai dėkingi VMS fondui, prisidėjusiam finansuojant tyrimus.**

#### Literatūra

1. Bockelmann W., Willems K. P., Ollo-Edimo M. L. Gefriertrocknung von Rotschmierbakterien. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. 2004, Vol. 56, Nr. 3, P. 179–193.
2. Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P. Relevant Factors for the preparation of freeze dried lactic acid bacteria. International Dairy Journal 2004, 14, (10), P. 835–847.
3. Jittinindana S., Brett Kenney P., Slider S. D. Cryoprotectants Affect Physical Properties of Restructured Trout During Frozen Storage. Journal of Food Science, 2005, 70 (1) P. C35–C41.
4. Kailasapahaty K., Sureeta B. S. Effect of storage on shelf life and viability of freeze-dried and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* cultures. Australian Journal of Dairy Technology, 2004, 59, (3), P. 204–208.
5. Lee Kibeom. Cold shock response in *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*: a comparison of the protection generated by brief pre-treatment at less severe temperatures. Process Biochemistry 2004, 39 (12), P. 2233–2239.
6. Mille Y., Obert J. P., Beney L., Gervais P. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behaviour in liquid medium. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88 (1), P. 71–76.
7. Modesto M., Mattarelli P., Biavati B. Resistance to freezing and freeze-drying storage processes of potential probiotic bifidobacteria. Annals of Microbiology, 54 (1), 2004, P. 43–48.
8. Oberauskas V., Kantautaitė J., Sutkevičienė R., Sederevičius A. et al. Investigation of the properties of probiotic *Lactobacillus plantarum* U-14 and *Lactobacillus fermentum* U-5 strains and their evaluation during the lyophilisation. Medycyna Weterynaryna, 2004, 60 (12), P. 1278–1282.
9. Silva J., Carvalho A. S., Ferreira R., Vitorino R. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98, (3), P. 775–782.
10. Wang Y., Corrieu G., Beal C. Fermentation and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. Journal of Dairy Science, 2005, 88 (1), P. 21–29.