

УДК 579.22

О. В. Басюл, м.н.с. ННБЦ

Г. В. Ямборко, к.т.н., доцент

В. О. Іваниця, д.б.н., професор, завідувач кафедри

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: v_ivanit@ukr.net

ВПЛИВ СКЛАДУ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІОФІЛІЗОВАНИХ БАКТЕРІЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU315

Вивчено вплив складу кріозахисних середовищ на збереження життєздатності та біотехнологічні властивості ліофілізованих бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* ONU315. Використання захисного середовища, до складу якого входить знежирене молоко (40 %), цукроза (20 %), натрій лимоннокислий (20 %), лактоза (9,5 %), мальтоза (9,5 %) і желатин (1 %) дозволяє зберегти життєздатність і біохімічну активність ліофілізованих бактерій штаму *L. plantarum* ONU315. Ліофілізовані лактобактерії штаму *L. plantarum* ONU315 упродовж 6 місяців зберігали антагоністичну активність до представників мікробіоти плодівих тіл гливи звичайної.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, захисне середовище, ліофілізація, збереження життєздатності, кислотоутворення, антагоністична активність.

Перспективним нововведенням у мікробіологічній промисловості та функціональному харчуванні є створення ліофілізованих культур лактобактерій для заквашування плодівих тіл їстівних грибів. Підбір захисного середовища (ЗС) для ліофілізації сприяє підвищенню стійкості бактеріальних клітин до ушкоджень у процесі ліофілічної сушки, стабілізації їх життєвих функцій і збереженню високої кількості життєздатних клітин протягом тривалого часу після сушки [3, 4].

Метою дослідження було вивчення впливу складу захисних середовищ на збереження життєздатності та біотехнологічних властивостей бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* ONU315 після ліофілізації.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження був штам лактобактерій *L. plantarum* ONU315, отриманий з плодівих тіл гливи звичайної штаму Китайський чорний, штучно культивованої в Одеській області. Попередні дослідження впливу цього штаму на мікробіологічні, біохімічні та органолептичні показники ферментованої гливи

звичайної вказало на доцільність використання штаму *L. plantarum* ONU315 у якості стартерної культури для заквашування [6].

Підготовку досліджуваних бактерій до ліофілізації проводили шляхом вирощування їх у рідкому середовищі MRS [7] в умовах періодичного культивування протягом 24 годин з наступним концентруванням на центрифугі Sigma 3-30K за 1500g протягом 15 хвилин. Суспензію бактерій доводили до вихідної концентрації $2,0 \pm 0,2 \cdot 10^{10}$ КУО/мл та змішували із захисним середовищем у співвідношенні 1:1, розливали порціями по 5 мл у стерильні пеніцилінові флакони, які прикривали стерильними марлевими серветками та ліофілізували упродовж доби на сублімаційній сушарці TG-55 (початкова температура -20 °С, кінцева – 30 °С) за показника вакууму – 0,8 кгс/см².

Флакони з ліофілізованою культурою в асептичних умовах закривали стерильними металевими ковпачками, маркували та закладали на зберігання за температури 4 °С.

Випробовували 12 варіантів захисних середовищ (ЗС) (табл. 1), розроблених з використанням найбільш часто застосовуваних для ліофілізації лактобактерій компонентів [1].

Таблиця 1

Склад захисних середовищ для ліофілізації *L. plantarum* ONU315

Захисне середовище	Компонент середовища, %								
	Желатин	Молоко знежирене	Натрій лимоннокислий	Натрій ортовокислий	Сорбітол	Цукроза	Лактоза	Мальтоза	Пептон
A	1	20	39	-	40	-	-	-	-
B	1	20	-	39	40	-	-	-	-
C	1	-	-	39	40	-	20	-	-
D	1	20	40	-	-	39	-	-	-
E	5	10	30	-	-	20	-	-	35
F	5	10	-	30	-	40	-	-	15
G	5	-	30	-	-	40	-	10	15
H	5	-	40	-	-	45	-	10	-
I	5	-	30	-	-	30	5	5	25
J	5	35	30	-	-	30	-	-	-
K	1	40	-	20	-	20	9,5	9,5	-
L	0,5	35,5	-	20	-	20	10	10	-

У всіх варіантах ЗС до ліофілізації концентрація бактерій складала $2,0 \pm 0,2 \cdot 10^{10}$ КУО/мл.

Для визначення якості та активності отриманих бактеріальних препаратів вивчали їх зовнішній вигляд, вміст вологи, а також бактеріальну чистоту, життєздатність і біохімічну активність бактерій штаму *L. plantarum* ONU315 одразу після ліофілізації та через 6 місяців зберігання.

Для переведення препаратів у рідкий стан у флакони з ліофілізованими бактеріями вводили фізіологічний розчин до вихідного об'єму. Мікробіологічну чистоту культури та морфологічну характеристику бактерій контролювали методами мікроскопії.

Відбір захисного середовища проводили за показниками збереження життєздатності і біохімічної активності ліофілізованих бактерій.

Життєздатність клітин лактобактерій після ліофілізації визначали висівом на щільне поживне середовище MRS. Рівень кислотоутворювальної активності *L. plantarum* ONU315 за 6 місяців зберігання виявляли титрометричним методом шляхом інкубації культури у молоці впродовж 24 год за температури 37 °С з подальшим титруванням 0,1 н. розчином КОН у присутності індикатора фенолфталеїну. Як контроль використовували не ліофілізовану культуру бактерій.

Антагоністичну активність лактобацил визначали методом агарових блоків діаметром 16 мм [5]. У якості тест-штамів мікроорганізмів для вивчення антагоністичної активності використовували виділені та ідентифіковані нами за допомогою газової хроматографії і автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA), представників резидентної мікробіоти гливи звичайної, що належать до видів: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Planococcus citreus*, *Sporosarcina ureae*, *Sporosarcina halophila*.

Статистичне опрацювання результатів здійснювали шляхом розрахунку середніх значень показників (\bar{X}) та їх стандартної похибки ($S_{\bar{x}}$). Вірогідність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента за рівнем значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що препарати бактерій штаму *L. plantarum* ONU315, ліофілізовані у ЗС А-І характеризувалися неоднорідною структурою. ЗС J-L забезпечили отримання препаратів у вигляді однорідної таблетки кремового кольору. Вміст вологи у препаратах склав не більше 3%. У препаратах всіх варіантів ЗС встановлено мікробіологічну чистоту ліофілізованої культури штаму *L. plantarum* ONU315.

Загальна кількість клітин лактобактерій, що вижили після ліофілізації, в залежності від ЗС складала 10^7 - 10^9 КУО/мл (табл. 2).

Таблиця 2

Кількість життєздатних бактерій *L. plantarum* ONU315 після ліофілізації

Захисне середовище	КУО/мл	
	одразу після ліофілізації	через 6 місяців
A	$1,4 \pm 0,1 \cdot 10^8$	$2,0 \pm 0,1 \cdot 10^7$
B	$8,0 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$7,4 \pm 0,1 \cdot 10^6$
C	$7,5 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$6,2 \pm 0,2 \cdot 10^6$
D	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^8$	$1,5 \pm 0,1 \cdot 10^7$
E	$2,0 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$2,7 \pm 0,2 \cdot 10^8$
F	$1,5 \pm 0,1 \cdot 10^9$	$3,1 \pm 0,1 \cdot 10^8$
G	$4,2 \pm 0,1 \cdot 10^7$	$3,4 \pm 0,3 \cdot 10^6$
H	$7,0 \pm 0,2 \cdot 10^7$	$6,1 \pm 0,1 \cdot 10^6$
I	$2,0 \pm 0,1 \cdot 10^7$	$3,1 \pm 0,3 \cdot 10^6$
J	$2,0 \pm 0,3 \cdot 10^9$	$4,2 \pm 0,2 \cdot 10^8$
K	$2,0 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$5,4 \pm 0,2 \cdot 10^8$
L	$2,1 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$7,2 \pm 0,3 \cdot 10^8$

Примітка: до ліофілізації кількість лактобактерій становила $2,0 \pm 0,2 \cdot 10^{10}$ КУО/мл.

Встановлено, що найбільшою захисною дією характеризувалися середовища E, F, J-L, до складу яких входили наступні компоненти: молоко, желатин, цукроза – у всіх середовищах, натрій лимоннокислий у середовищах E, J і K, натрій оцтовокислий – у середовищах F і L, лактоза і мальтоза – у середовищах K і L.

Життєздатність лактобактерій за використання ЗС А і D залишилася на високому рівні. Ці середовища містили: молоко, желатин, натрій лимоннокислий, а також сорбітол і цукрозу, відповідно. ЗС G-I не містили молоко, чим можна пояснити зниження кількості життєздатних клітин у порівнянні з вищерозглянутими середовищами.

Таким чином, найбільш ефективними компонентами ЗС для збереження життєздатності ліофілізованих лактобактерій штаму *L. plantarum* ONU315 виявилися молоко, желатин і цукроза.

За вивчення впливу складу ЗС на виживання лактобактерій у процесі ліофілізації, підтвердилися дані про те, що у ЗС моноцукри і полісахариди, а також

білки і продукти їхнього гідролізу є основними компонентами, оскільки вони виконують функцію стабілізатора зв'язаної води у клітинах [1].

Виявлено, що найкраще збереження кислотоутворювальної активності дослідженого штаму забезпечили ЗС D, H-L.

Активність кислотоутворення лактобактеріями після ліофілізації у ЗС D, що містило цукрозу, була вищою на 8 одиниць, ніж за ліофілізації у ЗС А з заміною цукрози на сорбітол, відповідно, цукроза є важливішим за сорбітол компонентом для збереження кислотоутворювальної активності досліджуваного штаму лактобактерій.

Компонентний склад ЗС G і H відрізнявся наявністю пептону у середовищі G, за використання якого кислотоутворювальна активність *L. plantarum* ONU315 виявилася нижчою на 14 одиниць, ніж за ліофілізації у ЗС H. ЗС I відрізняється від середовища H наявністю лактози та пептону. ЗС E і F, на відміну від J-L, містили пептон, проте показники кислотоутворення *L. plantarum* ONU315 за їх використання не перевищували 71 °Т. Таким чином, пептон не є важливим компонентом для застосування у захисних середовищах (рис. 1).

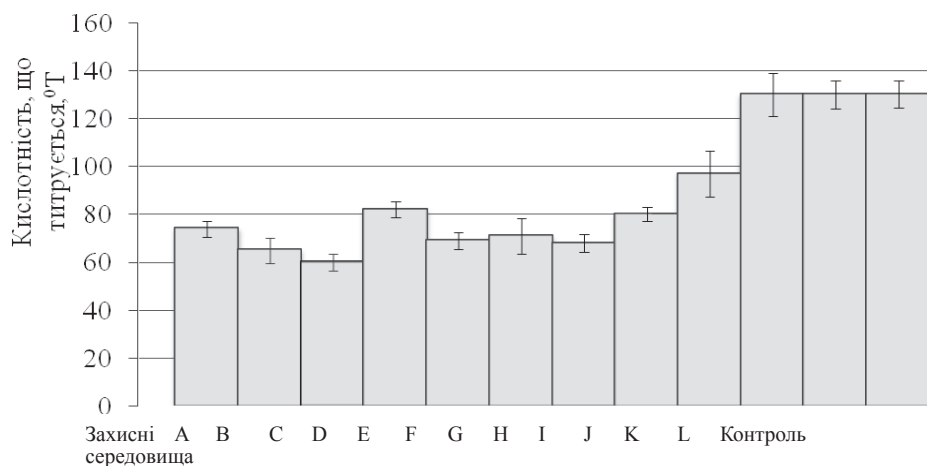


Рис. 1 – Вплив складу ЗС на збереження здатності до кислотоутворення ліофілізованих бактерій *L. plantarum* ONU315.

Підсумовуючи наведене можна констатувати, що найбільш ефективними компонентами ЗС для збереження кислотоутворювальної активності досліджуваних бактерій є натрій оцтовокислий та комбінація декількох цукрів з обов'язковим переважаючим вмістом цукрози. Максимальні показники кислотоутворення після інкубації за температури 37 °С протягом 24 год відмічені для бактерій, що ліофілізовані у ЗС I-L.

На підставі отриманих результатів збереження життєздатності та кислотоутворювальної активності лактобактерій для подальшого дослідження були відібрані ЗС А, D, H-L.

Важливою характеристикою лактобацил як заквасочних культур є здатність пригнічувати розвиток патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, обумовлена продукцією бактеріоцинів, органічних кислот, спиртів, перекису водню та інших метаболітів, що накопичуються в процесі росту бактерій роду *Lactobacillus* [2, 4].

За 6 місяців ліофілізовані лактобактерії штаму *L. plantarum* ONU315 зберігали антагоністичну активність до представників мікробіоти плодкових тіл гливи звичайної.

Відносно 50 штамів лактобактерій видів *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* не було виявлено антагоністичної активності досліджуваного штаму до ліофілізації та в жодному із дослідних варіантів після неї. Найкращому збереженню антагоністичної активності ліофілізованих лактобактерій сприяли ЗС Н-Л після 6 місяців зберігання.

Висновки

Згідно з отриманими даними, встановлено, що найбільш сприятливими компонентами ЗС для збереження життєздатності, кислотоутворення та антагоністичної активності у процесі ліофілізації лактобактерій штаму *L. plantarum* ONU315 є молоко, желатин, цукроза, натрій оцтовокислий, мальтоза і лактоза. До складу найбільш ефективного ЗС входить знежирене молоко (40 %), цукроза (20 %), натрій лимоннокислий (20 %), лактоза (9,5 %), мальтоза (9,5 %) і желатин (1 %). Враховуючи показники збереження життєздатності лактобактерій у процесі зберігання, кислотоутворення та антагоністичної активності для їх ліофілізації можуть бути рекомендовані ЗС К і Л.

Список використаної літератури

1. Белов А. Н. Влияние состава защитных сред при сублимации и хранении концентратов термофильных бактерий / А. Н. Белов, Л. П. Белова, Т. Л. Криворотова, Н. М. Гусева // Молочная промышленность. – 1993. – 32. – № 1. – С. 25–26.
2. Ганбаров Х. Г. Антибактериальная активность лактобактерий рода *Lactobacillus* / Х. Г. Ганбаров, М. М. Джафаров // Материалы VIII съезда Всероссийского Общества эпидемиологии, микробиологии и паразитологии. – Москва, 2006. – № 8. – С. 56.
3. Головач Т. М. Лактобацили: заморожування при низьких та ультранизьких температурах / Т. М. Головач, Л. І. Грома. – Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях. – Київ: Тов. «Знання України», 2004. – С. 39–44.
4. Дімова М. І. Бактеріоциногенні і пробіотичні властивості лактобацил: дис. кандидата біол. наук: 03.00.07 / Дімова Марія Іванівна. – К., 2007. – 136 с.
5. Донцова Т. А. Антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus* / Т. А. Донцова, Г. В. Швець, В. О. Іваниця // Вісник Одеського держ. ун-ту. – 2000. – Т. 5. – В. 1. – С. 146–150.
6. Basyul H. V. Lactic acid producing activity of lactobacilli strains, perspective for mushrooms fermentation / H. V. Basyul, H. V. Paliy // Збірник наукового товариства студентів, аспірантів та молодих вчених. Природничі науки. – Одеса, 2011. – С. 24–26.
7. Man J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // Journal Applied Bacteriology. – 1960. – V. 23. – P. 130–135.

Стаття надійшла до редакції 05.05.2014

Е. В. Басюл, А. В. Ямборко, В. О. Иваница,

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии, вирусологии и биотехнологии
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: v_ivanit@ukr.net

**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЗАЩИТНЫХ СРЕД НА СОХРАНЕНИЕ
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ
LACTOBACILLUS PLANTARUM ONU315**

Резюме

Изучено влияние состава криозащитных сред на сохранение жизнеспособности и биохимической активности лиофилизированного штамма лактобактерий. Установлено, что использование защитной среды, в состав которой входит обезжиренное молоко (40 %), сахароза (20 %), натрий лимоннокислый (20 %), лактоза (9,5 %), мальтоза (9,5 %) и желатин (1 %) позволяет сохранить жизнеспособность и биохимическую активность лиофилизированного штамма *L. plantarum* ONU315. Показано, что при хранении лиофилизированной культуры штамма на протяжении 6 месяцев, бактерии – представители микробиоты плодовых тел вешенки обыкновенной остаются чувствительными к его антагонистическому действию.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, защитная среда, лиофилизация, сохранение жизнеспособности, кислотообразование, антагонистическая активность.

O. V. Basiul, G. V. Yamborko, V. O. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University,
Department of Mikrobiology, Virology and Biotechnology
2, Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: v_ivanit@ukr.net

**PROTECTIVE MEDIA COMPOSITION INFLUENCE ON FREEZE-
DRIED BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU315
VIABILITY AND BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES SAVING**

Summary

Cryoprotective media composition effect on viability and biochemical activity saving of freeze-dried lactobacilli strain was studied. It was established that protective media, which includes skim milk (40 %), sucrose (20 %), sodium citrate (20 %), lactose (9,5 %), maltose (9,5 %) and gelatin (1 %), could retain viability and biochemical activity of lyophilized strain *L. plantarum* ONU315. It is shown, that bacteria – the representatives of oyster mushroom fruiting bodies microbiota, remain sensitive to strain lyophilized culture antagonistic action during storage for 6 months.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, protective media, lyophilization, viability saving, acid production, antagonistic activity.