

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 плодових 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 плодових тіл їстівних грибів. Підбір захисного середовища (ЗС) для ліофілізації сприяє підвищенню стійкості бактеріальних клітин до ушкоджень у процесі ліофільної 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 плодових 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/см<sup>2</sup>.

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 A 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 A 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).

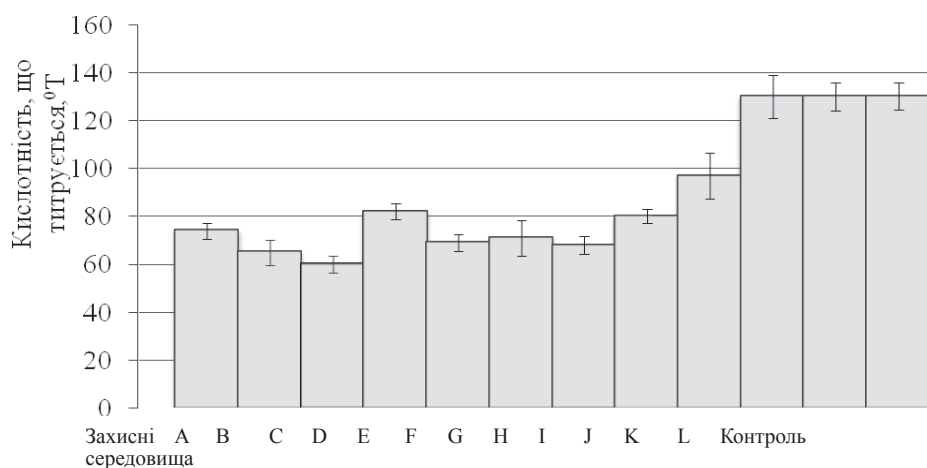


Рис. 1 – Вплив складу ЗС на збереження здатності до кислотоутворення ліофілізованих бактерій *L. plantarum* ONU315.

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 A, 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.