

Г.В. Ямборко, І.Л. Соловійова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, yamborko@sky.od.ua

ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ СПОСОБІВ ЗБЕРІГАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*

*Проведено вивчення ефективності різних способів зберігання (ліофілізація, висушування у завислому (киплячому) шарі інертного матеріалу та під стерильною вазеліною оливою) 4 штамів бактерій роду *Lactobacillus* з колекції культур кафедри мікробіології та вірусології ОНУ: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* N2, *L. acidophilus* 317/402, *L. acidophilus* OL4. Спосіб висушування культур у киплячому шарі інертного матеріалу забезпечував максимальний рівень виживання досліджуваних штамів лактобацил та збереження їх антагоністичних властивостей протягом 36 місяців.*

К л ю ч о в і с л о в а: лактобацили, способи зберігання, життєздатність, антагоністичні властивості.

Актуальною проблемою є пошук способів тривалого зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus*, основним завданням якого є підтримка їх життєздатності, таксономічно важливих та біотехнологічних ознак. Вирішення проблеми довготривалого зберігання мікроорганізмів полягає в забезпеченні умов анабіозу, тобто в гальмуванні процесів обміну речовин. В колекціях культур життєздатність мікроорганізмів підтримується переважно шляхом субкультивування, зберігання під шаром вазелінової оливи, за низьких та ультранизьких температур, у висушеному стані на фільтрувальному папері та у ліофільно висушеному стані [1]. Однією з причин зниження життєздатності культур бактерій та їх фізіологічної активності в процесі зберігання різними методами є зміна складу мікробної популяції під дією ряду фізико-хімічних факторів зовнішнього середовища, а також накопичення у культурі біохімічно неактивних дисоціантів [2].

Метою даної роботи було порівняння ефективності різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* з колекції культур кафедри мікробіології та вірусології ОНУ. Задачі роботи включали дослідження життєздатності лактобацил за різних умов довгострокового зберігання та вивчення їх антагоністичної активності щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були штами бактерій роду *Lactobacillus*, що застосовуються як стартерні культури при виробництві комерційних препаратів і



продуктів лікувально-профілактичного призначення: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2, і штамп *L. acidophilus* OL4, ізольований з некомерційного кисломолочного продукту, виготовленого в Одеському регіоні. Штамп *L. acidophilus* 317/402 (кисломолочний продукт «Наріне», Україна) використовували як контроль. Вирощування лактобактерій проводили у рідкому середовищі MRS [3] за умов періодичного культивування протягом 10 годин. Біомасу досліджуваних штамів лактобацил концентрували методом ультрафільтрації в кінці логарифмічної фази росту; загальна кількість клітин лактобактерій у 1 см³ рідкого концентрату дорівнювала 1 - 2 x 10¹⁰. Для довгострокового зберігання бактерій роду *Lactobacillus* були використані такі методи зневоднювання як ліофілізація та висушування в завислому (киплячому) шарі інертного матеріалу (фторопласту). Суспензію клітин лактобактерій ліофілізували на сублімаційній сушарці TG15 (початкова температура — 30±2 °С, кінцева +20±2 °С, залишковий тиск становив не більше 13,3 x 10³ Па; тривалість висушування 24 - 28 годин. Отриманий бактеріальний концентрат із захисним середовищем [4] висушували на установці завислого шару на інертних носіях при температурі сушильного агенту 76 °С. Сухі концентрати досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* були закладені на зберігання при температурі 4 °С. Усі культури відновлювали у фізіологічному розчині через 6, 12, 24 та 36 місяців зберігання.

Одночасно досліджувані штами лактобактерій зберігали під стерильною вазеліною оливою у напіврідкому середовищі MRS. Загальна кількість клітин лактобактерій у 1 см³ бактеріальної суспензії дорівнювала 10⁷ - 10⁸. Тривалість збереження культур під шаром вазеліну складала 12 місяців при температурі +5 °С.

Життєздатність лактобактерій визначали методом дозованого висіву на MRS-агар і підрахунку колоній, що виростили через 18 - 24 години. Антагоністичну активність лактобактерій стосовно різних мікроорганізмів вивчали лунково-дифузійним методом [5]. Як індикаторні мікроорганізми використовували колекційні штами бактерій *Escherichia coli* ОНУ 165, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus vulgaris* ОНУ 209, *Bacillus subtilis* ОНУ 24, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Candida albicans* УКМ У-2501 та *Saccharomyces cerevisiae* В4.

Результати та їх обговорення

Першим етапом нашої роботи було вивчення життєздатності досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* після 6, 12, 24 та 36 місяців їх зберігання у висушеному та ліофільному стані. У таблиці 1 наведено результати досліджень щодо впливу ліофілізації на виживання лактобацил. Як видно з представлених даних, одразу після ліофілізації кількість життєздатних клітин змінилася незначно: частка бактерій, що вижила, становила від 82 до 93 %. Після 6 місяців зберігання для усіх досліджуваних штамів лактобацил спостерігали однакову тенденцію: кількість життєздатних бактерій знизилася лише на порядок. Після 36 місяців зберігання лактобацил у ліофільному стані кількість життєздатних клітин зменшилася на шість порядків для штамів *L. plantarum* 8P-A3 та *L. acidophilus* OL4. Максимальну кількість життєздатних клітин після 2,5 років зберігання у ліофільному стані (4,2 x 10⁶) було відзначено для штаму *L. acidophilus* 317/402.



Таблиця 1

Життєздатність лактобактерій після ліофілізації

Штам	Кількість клітин у 1 г сухого концентрату					
	До Ліофілізації	Одразу після ліофілізації	Після 6 міс.	Після 12 міс.	Після 24 міс.	Після 36 міс.
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	$1,4 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	$9,2 \times 10^9$	$8,5 \times 10^7$	$7,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> N2	$1,2 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$
<i>L. acidophilus</i> OL4	$1,5 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^9$	$7,2 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> 317/402	$1,8 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{10}$	$9,0 \times 10^8$	$7,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6$

Відомо, що найбільш прийнятним і якісним способом зневоднювання, який забезпечує збереження і стабілізацію властивостей бактерій, є сублімаційне висушування, при якому відсутні високі температури нагрівання. Однак, у деяких роботах указується на те, що незважаючи на високу якість продуктів, одержуваних методом сублімації, резерви цього способу зневоднювання не повністю використовуються через низку недоліків, основні з яких – велика тривалість і трудомісткість процесу [6,7]. Ряд дослідників [8, 9] вважає, що в процесі сублімаційного висушування спостерігаються значні втрати життєздатності мікробних клітин.

За останні роки для зневоднювання розчинів і суспензій широко застосовують висушування в киплячому шарі інертного матеріалу. Даний спосіб зневоднювання, уперше запропонований і використаний у 1959 році [10], вигідно відрізняється від інших тим, що він збільшує поверхню тепло- і масообміну (практично вся поверхня інертних гранул). Активна гідродинаміка (особливо в апаратах киплячого шару) сприяє компактному апаратному оформленню процесу [7]. Тому саме цей спосіб зневоднювання обраний для зберігання промислових штамів лактобацил.

Таблиця 2

Життєздатність лактобактерій після висушування у киплячому шарі інертного матеріалу

Штам	Кількість клітин у 1 г сухого концентрату					
	До висушування	Одразу після ліофілізації	Після 6 міс.	Після 12 міс.	Після 24 міс.	Після 36 міс.
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	$1,4 \times 10^{10}$	$9,8 \times 10^9$	$7,6 \times 10^9$	$8,5 \times 10^7$	$5,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> N2	$1,2 \times 10^{10}$	$9,0 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
<i>L. acidophilus</i> OL4	$1,5 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^9$	$7,2 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
<i>L. acidophilus</i> 317/402	$1,8 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$	$5,7 \times 10^8$	$7,6 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$



Виявлено, що одразу після висушування бактеріальних концентратів лактобацил у киплячому шарі на інертних носіях частка життєздатних клітин складала від 70 до 86 %, що значно менше, ніж виживання клітин одразу після ліофілізації (табл. 1). Після 6 місяців зберігання спостерігали поступове зниження кількості життєздатних клітин, а після першого року зберігання і до кінця терміну дослідження кількість життєздатних клітин усіх штамів лактобацил залишалася практично стабільною; виключенням був штам *L. plantarum* 8P-A3, який характеризувався мінімальною кількістю життєздатних клітин після 2,5 років зберігання у висушеному стані ($4,1 \times 10^6$).

Після зберігання комерційних штамів бактерій роду *Lactobacillus* на живильному MRS середовищі під вазеліною оливою (табл. 3) було виявлено, що життєздатність бактерій штаму *L. plantarum* 8P - A3 знизилася на шість порядків після зберігання протягом 12 місяців, а штамів *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2 та *L. acidophilus* 317/402 – на п'ять порядків. Найкращі результати були отримані після зберігання штаму *L. acidophilus* OL4: кількість життєздатних клітин після першого року зберігання знизилася на чотири порядки і дорівнювала $5,1 \times 10^4$.

Таблиця 3

Життєздатність лактобактерій після зберігання їх під вазеліною оливою

Штам	Кількість клітин у 1 мл бактеріальної суспензії		
	До зберігання	Після 6 міс.	Після 12 міс.
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	$1,2 \times 10^8$	$9,8 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2$
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> N2	$5,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^5$	$7,8 \times 10^3$
<i>L. acidophilus</i> OL4	$1,7 \times 10^8$	$1,1 \times 10^5$	$5,1 \times 10^4$
<i>L. acidophilus</i> 317/402	$1,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$	$7,1 \times 10^3$

Важливою характеристикою заквашувальних культур для продуктів лікувально-профілактичного призначення є їх здатність пригнічувати розвиток патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Було досліджено спектри антагоністичної дії чотирьох штамів бактерій роду *Lactobacillus* після максимального терміну зберігання за різних умов. Антагоністична активність молочнокислих бактерій складається з дії бактеріоцинів, а також кислот, спиртів, перекисів і інших метаболітів, що накопичуються в процесі росту бактерій [5]. Досліджувані штами бактерій роду *Lactobacillus* вирізнялися широким спектром антибіотичної активності. Вони активно пригнічували ріст як грампозитивних бактерій (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), так і грамнегативних бактерій (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), і незначно пригнічували ріст *Proteus vulgaris*. У даних дослідженнях лактобацили, досить активні стосовно різних мікроорганізмів, слабо пригнічували ріст дріжджів *Candida albicans* та *Saccharomyces cerevisiae*. Ймовірно, це пов'язано зі стійкістю дріжджів до пригнічувальної дії метаболітів лактобацил порівняно з іншими індикаторними мікроорганізмами. У ряді випадків спостерігалася навіть стимуляція лактобацилами росту дріжджеподібних грибків [11].



Найбільш виражену антагоністичну активність стосовно індикаторних культур виявив штам *L. acidophilus* OL4, ізольований з некомерційного кисломолочного продукту. Результати експерименту щодо збереження антагоністичних властивостей досліджуваних промислових штамів лактобацил продемонстровано на рис. 1 та 2 на прикладі штаму *L. acidophilus* OL4.

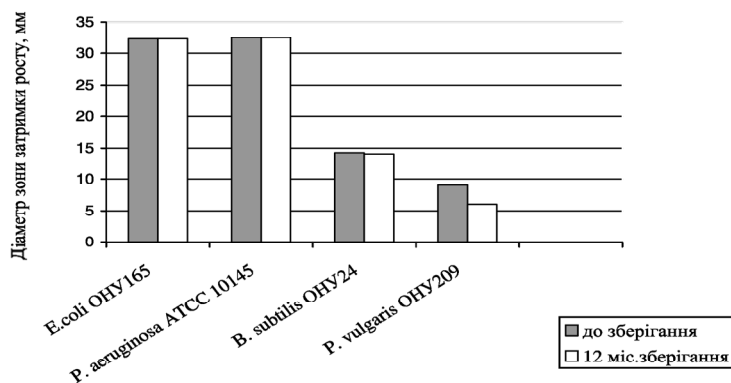


Рис.1 Антагоністична активність *L. acidophilus* OL4 за умов зберігання під вазеліною оливою протягом 12 місяців

Аналіз отриманих даних показав, що спосіб зберігання лактобацил під вазеліною оливою забезпечував високий рівень антагоністичної активності до всіх індикаторних прокаріотних мікроорганізмів, однак число життєздатних клітин при цьому зменшилося на три - п'ять порядків (табл.3). Дослідження антагоністичної активності штамів бактерій роду *Lactobacillus* після довгострокового зберігання (рис. 2) показало, що після ліофілізації та висушування у киплячому шарі інертного матеріалу досліджуваний штам не пригнічував ріст *M. luteus* і *C. albicans*. В цьому випадку спостерігали стимуляцію росту індикаторних мікроорганізмів. До решти індикаторних мікроорганізмів лактобактерії виявляли виражений антагоністичний ефект, проте спостерігалася тенденція до зниження антибіотичної активності відновлених після ліофілізації культур.

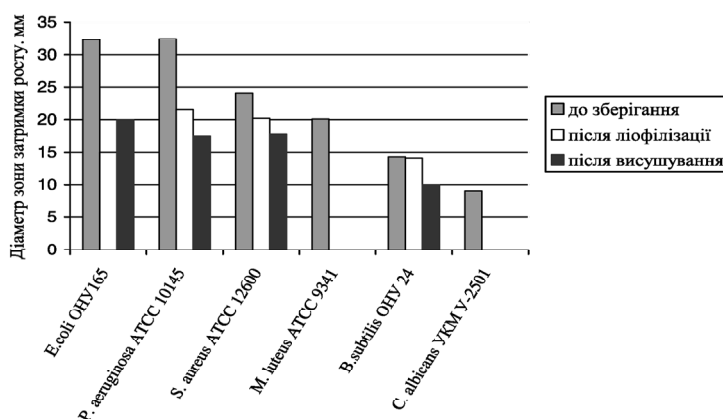


Рис.2. Антагоністична активність *L. acidophilus* OL4 за умов зберігання протягом 36 місяців у ліофільному та висушеному стані.

Однак доведено, що періодичні пасажі ліофілізованих культур молочнокислих бактерій і підтримувальна селекція відновлювали їх фізіологічну активність. Усі досліджувані штами лактобацил, висушені в киплячому шарі на інертних носіях, зберігали високий ступінь антагоністичної активності стосовно *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, але слабо інгібували ріст *Proteus vulgaris* та *Bacillus subtilis*.

Таким чином, ліофілізація забезпечує тривале збереження життєздатності лактобацил, однак була відзначена деяка тенденція до зниження антибіотичної активності ліофілізованих культур. Висушування бактерій у киплячому шарі інертного матеріалу забезпечує відносно високий рівень виживання лактобацил та збереження їх антагоністичних властивостей. Спосіб зберігання лактобацил під вазеліною оливою забезпечує високий рівень антагоністичної активності, але число життєздатних клітин при цьому знижується на чотири - шість порядків протягом 12 місяців.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Методы. Проблемы. Перспективы. — Пушино, 1991. — С. 81-159.
2. Герна Р.А. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии. — М., 1983. — Т. 1. — с. 74 — 122.
3. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* // J. Appl. Bacteriol. — 1960. — 23. — P. 130-138.
4. Ямборко Г.В. Висушування концентрованої бактеріальної закваски в киплячому шарі інертного матеріалу // Холодильна техніка і технологія. — О.: ОДАХ, 2002. — Т. 79-80, № 5-6. — С. 9 -95.
5. Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Vact. Rev. -1976. — 40. — P. 722-756.
6. Гришин М.А., Атаназевич В.И., Семенов Ю. Г. Установки для сушки пищевых продуктов. — М.: Агропромиздат, 1989. — 208 с.
7. Кретов И.Т., Антипов С.Т., Шахов С.В. Исследование процесса сублимационной сушки молочных заквасок // Хранение и переработка сельхозсырья. — 1996. — № 4. — С. 15-16.
8. Шабетник Г. Д., Кузьмин В. М. Новое в производстве сухих бакконцентратов и биологически активных добавок // Молочная промышленность. — 1999. - № 8. — С. 27-29.
9. Гинзбург А.С., Резчиков В.А. Сушка пищевых продуктов в кипящем слое. — М.: Пищевая промышленность, 1966. — 196 с.
10. Бабенко В.Е., Соловьева Т.А., Ойгенблик А.А. Исследование и моделирование процесса покрытия частиц пленками в аппаратах со взвешенным слоем. В сб.: Тепло- и массоперенос. — К.: Наук. думка., 1972. — Т. 5. — Ч. 1. — С. 172-179.
11. Hilton E., Isenberg H. D., Alperstein P., France K., Borenstain M.T. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidial vaginitis // Ann. Intern. Med. — 1992. — V. 116. — P. 353-357.



А.В. Ямборко, И.Л. Соловьева

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 687964,
yamborko@sky.od.ua

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ СПОСОБОВ ХРАНЕНИЯ
ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА
*LACTOBACILLUS***

Реферат

Проведено сравнение эффективности различных способов хранения (лиофилизация, высушивание во взвешенном (кипящем) слое инертного материала и под стерильным вазелиновым маслом) 4 штаммов бактерий рода *Lactobacillus* из коллекции культур кафедры микробиологии и вирусологии ОНУ: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2, *L. acidophilus* 317/402, *L. acidophilus* OL4. Способ высушивания культур в кипящем слое инертного материала обеспечивал максимальный уровень выживания исследуемых штаммов лактобацилл и сохранение их антагонистических свойств на протяжении 36 месяцев.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лактобациллы, способы хранения, жизнеспособность, антагонистические свойства.

G.V. Yamborko, I.L. Solovyova

Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine, tel.: 8 (0482) 687964, yamborko@sky.od.ua

**THE EFFECTIVENESS OF DIFFERENT STORAGE TECHNIQUES OF
INDUSTRIAL STRAINS OF GENUS *LACTOBACILLUS***

Summary

The different storage techniques (lyophilization, drying method and a method of keeping under mineral oil) of 4 lactobacilli strains: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2, *L. acidophilus* 317/402 and *L. acidophilus* OL4 from Odesa National University collection of the sea and useful for ecological biotechnology microorganisms were compared. Drying of bacterial cultures in the layer of an inert material was the method which provided the highest level of viability of the investigated lactobacilli strains and kept their antagonistic properties during 36 months.

К e y w o r d s: lactobacilli, the storage techniques, viability, antagonistic properties.

