

УДК 579.864

Л. В. Устюжанинова, В. И. Сушкова

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ СУСПЕНЗИИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА ФЕРМЕНТОЛИЗАТЕ ОТРУБЕЙ

При производстве пробиотических и синбиотических препаратов важно получить продукт с максимальным количеством жизнеспособных клеток бактерий-пробиотиков. Поэтому при разработке технологии данных производств необходимо исследовать эффективность разных режимов концентрирования продукта для выбора оптимального. В данной работе эффективность центрифугирования оценивалась по количеству живых клеток лактобактерий и количеству абсолютно сухих веществ, перешедших из суспензии в концентрат. Результаты исследования показали, что наиболее эффективным оказалось центрифугирование при 3600 об/мин на центрифуге Centra-CL2. Увеличение скорости вращения (до 6000 об/мин) приводило к гибели части клеток лактобактерий. Полученные данные могут быть полезны исследователям и разработчикам технологий получения препаратов, содержащих живые лактобактерии.

Ключевые слова: концентрирование, центрифугирование, лактобактерии, ферментолитат отрубей.

В настоящее время в животноводстве и птицеводстве для профилактики и лечения различных инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта всё чаще применяются пробиотики и синбиотики [1]. При производстве пробиотических и синбиотических препаратов важно получить продукт с максимальным количеством жизнеспособных клеток бактерий. Поэтому при разработке технологии необходимо исследовать эффективность разных режимов всех стадий производства для выбора оптимального, который бы обеспечил максимальное сохранение живых микроорганизмов-пробиотиков.

Ранее нами была предложена технология производства кормовых синбиотиков и синбиотических добавок на основе пшеничных отрубей с

использованием лактобактерий [2]. Одной из стадий производства является концентрирование суспензии лактобактерий. Поэтому целью данной работы было исследование эффективности разных режимов центрифугирования суспензии лактобактерий, выращенных на ферментализате отрубей, и выбор оптимального режима.

В качестве объектов исследования были взяты 3 штамма лактобактерий, приобретённые из Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) при ФГУП ГосНИИГенетика: *Lactobacillus casei* ВКПМ В-4990, *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-4992 и *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-2991, выделенные из пищеварительного тракта здорового поросёнка, телёнка и курицы соответственно. Согласно паспортам, все штаммы устойчивы к ряду антибиотиков, генетически не модифицированы, не патогенны для человека, при работе не требуют специальных мер предосторожности. Данные штаммы обладают явно выраженными пробиотическими свойствами, в том числе высокой антагонистической активностью и кислотообразующей способностью [2].

Ферментализат отрубей готовили следующим образом [3]. Пшеничные отруби смешивали с водой в соотношении по массе 1:10, кипятили 15 мин, охлаждали до 55 °С, доводили значение рН до 4,7-5,0 добавлением концентрированной соляной кислоты. Затем добавляли ферментные препараты Амило-субтилин ГЗХ, Глюкаваморин ГЗХ и ОптимаШ™ ВГ в количестве 1,0 г/кг условного крахмала; 0,8 г/кг условного крахмала и 0,05 г/кг сухих веществ соответственно. Ферментируемую смесь выдерживали на водяной бане при температуре 55 °С 2 часа, периодически перемешивая. Затем доводили рН ферментализата до 7,0–7,2 раствором NaOH, добавляли мочевины в количестве 0,02 г/дм³ и стерилизовали при 1 ати в течение 40 минут.

Культивирование осуществляли в микроаэрофильных условиях в термостате ТС-80М-2 во флаконах объемом 250 и 500 см³, содержащих по 150 и 300 см³ ферментализата отрубей соответственно, при температуре 37 °С и рН среды 6,0–7,0 в течение 8–24 часов. Стагирование рН производили периодическим

добавлением в культуральную жидкость 2 н раствора NaOH. Значение pH определяли с помощью pH-метра pH-410 (Аквилон, Россия).

Центрифугирование осуществляли при комнатной температуре (20–22°C) на центрифугах Centra-CL2 (Thermo Electron Corporation, США) при 1000, 3000 и 3600 об/мин и SIGMA 3-16PK (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия) при 6000 об/мин. Время центрифугирования составляло 10 мин во всех случаях.

Количество жизнеспособных клеток лактобактерий в 1 см³ бактериальной суспензии для анализа определяли чашечным методом Коха [4] на среде Лактобакагар (ФБУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболensk). Суспензию для анализа готовили следующим образом: при соблюдении правил асептики отбирали навеску исследуемого образца массой около 1 г (точную массу записывали с точностью до 0,01 г), добавляли 100 см³ стерильного физраствора и тщательно перемешивали. Концентрацию живых лактобактерий в исходных образцах рассчитывали с учётом массы навески и объёма физраствора, взятого для её суспендирования (100 см³).

Количество абсолютно сухих веществ (АСВ) рассчитывали по влажности продукта, которую определяли методом высушивания навески до постоянной массы при 100-105 °С по ГОСТ 13496.3-92 [5].

Результаты исследования эффективности центрифугирования суспензии лактобактерий штамма *Lactobacillus casei* ВКПМ В-4990, полученной после ферментации на ферментоллизате отрубей, представлены в таблицах 1-2.

По данным таблиц 1 и 2 видно, что наиболее эффективным оказалось центрифугирование при 3600 об/мин на центрифуге Centra-CL2 (на данной центрифуге это максимальная скорость вращения пробирок объёмом 50 см³). В концентрат из исходной суспензии перешло более 90% жизнеспособных клеток лактобактерий штамма *L. casei* ВКПМ В-4990. При этом содержание живых клеток в концентрате по сравнению с исходной суспензией увеличилось в 1,9-4,4 раза.

В концентрат перешло от 52,1% до 91,9% АСВ из исходной суспензии. При этом при увеличении времени ферментации лактобактерий увеличивается доля АСВ, перешедших в концентрате из исходной суспензии после центрифугирования при всех исследованных режимах (табл. 1-2). Возможно, это связано с уменьшением концентрации растворимых питательных веществ в культуральной жидкости во время ферментации вследствие их ассимиляции. Содержание АСВ в концентрате по сравнению с исходной суспензией увеличивалась примерно в 2 раза во всех случаях независимо от времени культивирования.

Таблица 1

Эффективность центрифугирования суспензии лактобактерий штамма *Lactobacillus casei* ВКПМ В-4990 после ферментации на ферментоллизате отрубей в течение 12–24 часов

Время культивирования, ч	12		20	24	
	1000	3000	1000	3600	6000
Скорость вращения, об/мин	1000	3000	1000	3600	6000
Фактор разделения	167,6	1507,6	167,6	2170,9	3819,2
Концентрация живых клеток в исходной суспензии, $\times 10^9$ КОЕ/г	1,3 \pm 0,2		1,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
Концентрация живых клеток в концентрате, $\times 10^9$ КОЕ/г	1,6 \pm 0,3	3,1 \pm 0,2	1,5 \pm 0,4	2,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2
Доля живых клеток в концентрате от живых клеток в исходной суспензии, %	50,4	91,5	53,5	96,7	71,7
АСВ в исходной суспензии, %	7,7	7,9	8,3	8,8	8,8
АСВ в концентрате, %	11,5	14,1	12,5	16,0	12,7
Доля АСВ в концентрате от АСВ в исходной суспензии, %	60,00	65,94	67,61	91,94	90,36

Таблица 2

**Эффективность центрифугирования суспензии лактобактерий
штамма *Lactobacillus casei* ВКПМ В-4990 после ферментации на ферменто-
лизате отрубей в течение 8–12 часов**

Время культивирования, ч	8			12				
	1000	3600	6000	1000	3600	6000	3600	6000
Скорость вращения, об/мин	1000	3600	6000	1000	3600	6000	3600	6000
Фактор разделения	167,6	2170,9	3819,2	167,6	2170,9	3819,2	2170,9	3819,2
Концентрация живых клеток в исходной суспензии, $\times 10^9$ КОЕ/г	1,5 \pm 0,2			1,1 \pm 0,2			0,8 \pm 0,1	
Концентрация живых клеток в концентрате, $\times 10^9$ КОЕ/г	2,0 \pm 0,4	6,7 \pm 0,8	1,7 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3	2,5 \pm 0,5	1,5 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3
Доля живых клеток в концентрате от живых клеток в исходной суспензии, %	42,4	99,8	40,3	69,7	99,3	77,4	92,8	69,8
АСВ в исходной суспензии, %	7,5			8,4			7,9	
АСВ в концентрате, %	12,4	17,0	11,4	13,0	15,4	12,2	16,1	12,2
Доля АСВ в концентрате от АСВ в исходной суспензии, %	52,9	52,1	56,7	72,5	77,9	78,9	63,7	62,5

Концентрирование при 1000 об/мин на центрифуге Centra-CL2, а также при 6000 об/мин на центрифуге SIGMA 3-16PK оказалось менее эффективным: в концентрат перешло только 30,5-50,4% и 40,3-77,4% живых клеток соответственно. Поэтому концентрация жизнеспособных клеток лактобактерий в концентрате увеличилась незначительно по сравнению с исходной суспензией. При концентрировании на данных скоростях масса полученного концентрата была больше, чем при центрифугировании на скорости 3600 об/мин, но с меньшим содержанием АСВ. Поэтому при расчёте доли АСВ, перешедших в концентрат, полученные значения в большинстве случаев мало отличаются для разных режимов концентрирования одной и той же суспензии лактобактерий штамма *L. casei* ВКПМ В-4990 (табл. 1-2).

При концентрировании на центрифуге Centra-CL2 при 3000 об/мин эффективность процесса была выше, чем при центрифугировании на скорости 1000 об/мин, но несколько ниже, чем при концентрировании на скорости 3600 об/мин (табл. 1).

Также была исследована эффективность центрифугирования суспензий лактобактерий штаммов *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-4992 и *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-2991 на ферментализате отрубей, полученных после 8 часов ферментации. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Эффективность центрифугирования суспензии лактобактерий штаммов *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-4992 и *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-2991 после 8 часов ферментации на ферментализате отрубей

Штамм лактобактерий	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ В-4992			<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ В-2991		
	1000	3600	6000	1000	3600	6000
Скорость вращения, об/мин	1000	3600	6000	1000	3600	6000
Фактор разделения	167,6	2170,9	3819,2	167,6	2170,9	3819,2

Биологические науки

Концентрация живых клеток в исходной суспензии, $\times 10^8$ КОЕ/г	3,6 \pm 0,9			1,1 \pm 0,6		
Концентрация живых клеток в концентрате, $\times 10^8$ КОЕ/г	3,6 \pm 0,3	10,7 \pm 1,3	6,4 \pm 0,2	3,0 \pm 0,4	3,4 \pm 0,4	2,1 \pm 0,7
Доля живых клеток в концентрате от живых клеток в исходной суспензии, %	45,7	96,5	93,0	94,7	95,8	78,8
АСВ в исходной суспензии, %	8,9			8,1		
АСВ в концентрате, %	13,0	18,0	12,4	13,1	15,8	13,0
Доля АСВ в концентрате от АСВ в исходной суспензии, %	66,1	65,0	72,8	57,1	60,5	65,8

По данным таблицы 3 видно, что наиболее эффективным оказалось центрифугирование на центрифуге Centra-CL2 при 3600 об/мин. В концентрат из исходной суспензии перешло 96,5% живых клеток лактобактерий штамма *L. acidophilus* ВКПМ В-4992 и 95,8% живых клеток лактобактерий штамма *L. acidophilus* ВКПМ В-2991. При этом концентрация живых клеток в концентрате по сравнению с исходной суспензией увеличивалась в 3 раза. Также в концентрат из исходной суспензии перешло 65,0% и 60,5% АСВ для указанных двух штаммов соответственно. При этом доля АСВ в концентрате по сравнению с исходной суспензией увеличивалась примерно в 2 раза.

При концентрировании суспензии лактобактерий штамма *L. acidophilus* ВКПМ В-4992 при 1000 об/мин наблюдалась очень низкая эффективность процесса: только 45,7% живых клеток перешло в концентрат, поэтому концентрация жизнеспособных клеток лактобактерий в концентрате не увеличилась по сравнению с исходной суспензией. Клетки данного штамма лактобактерий

практически не осаждались на указанной скорости из-за своего очень маленького размера. В свою очередь, клетки лактобактерий штамма *L. acidophilus* ВКПМ В-2991, которые по размерам заметно больше клеток лактобактерий штаммов *L. casei* ВКПМ В-4990 и *L. acidophilus* ВКПМ В-4992, хорошо осаждались уже при 1000 об/мин (табл. 3).

При концентрировании суспензии лактобактерий штаммов *L. acidophilus* ВКПМ В-4992 и *L. acidophilus* ВКПМ В-2991 на скоростях 1000 об/мин и 6000 об/мин масса полученных концентратов была больше, чем при центрифугировании на скорости 3600 об/мин, но с меньшим содержанием АСВ.

В случае всех трёх штаммов фугат, полученный после центрифугирования при 6000 об/мин содержал живых клеток не больше, чем фугат, полученный после центрифугирования при 3600 об/мин. Таким образом, пониженное содержание жизнеспособных клеток лактобактерий в концентрате после центрифугирования при 6000 об/мин (табл. 1-3) можно объяснить только гибелью части клеток из-за воздействия центробежной силы. Более устойчивыми оказались клетки лактобактерий штамма *L. acidophilus* ВКПМ В-4992 (табл. 3), имеющие наименьший размер по сравнению с остальными исследованными штаммами.

Таким образом, концентрирование суспензии лактобактерий всех трёх исследуемых штаммов на ферментализате отрубей оказалось наиболее эффективным при центрифугировании в центрифуге Centra-CL2 на скорости 3600 оборотах в минуту. При этом концентрация живых лактобактерий увеличивалась в 1,9–4,4 раза по сравнению с исходной суспензией. Полученный концентрат содержал 15,4–18,0% АСВ. Увеличение скорости вращения (до 6000 об/мин) приводило к гибели части клеток лактобактерий. Центрифугирование при 1000 об/мин не позволяло достаточно эффективно отделить клетки штаммов *L. casei* ВКПМ В-4990 и *L. acidophilus* ВКПМ В-4992, обладающих не большими размерами.

Список литературы

1. Панин А. Н., Малик Н. И. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных // Ветеринария. – 2006. – № 7. – С. 3–6.
2. Устюжанинова Л. В., Сушкова В. И. Технология производства кормовых синбиотических продуктов // Современные тенденции в сельском хозяйстве : сб. трудов I междунар. интернет-конф. / отв. ред. Е. Д. Изотова. – Казань : Изд-во «Казанский университет», 2012. – С. 190–196.
3. Устюжанинова Л. В., Сушкова В. И. Получение кормовых пробиотиков на основе ферментолизата отрубей // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы V Всерос. конф. / под ред. Н. Г. Базарновой, В. И. Маркина. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 523–525.
4. Руководство по практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие / под ред. Н. С. Егорова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
5. ГОСТ 13496.3–92. Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения влаги. – М. : Стандартинформ, 2011. – 4 с.

СУШКОВА Валентина Ивановна – профессор кафедры биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: usr00410@vyatsu.ru

УСТЮЖАНИНОВА Людмила Васильевна – инженер кафедры биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: lv_ustyuzhaninova@vyatsu.ru