

УДК 579.864

М. М. Сорокожердьева, Н. В. Позолотина, И. В. Маракулин

ОБОСНОВАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПРОТЕКТОРОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОВЫШЕНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ЛАКТОБАЦИЛЛ В СУСПЕНЗИЯХ ПРИ ХРАНЕНИИ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ (6±2) °С

В данной работе изучены методические подходы повышения выживаемости лактобактерий в суспензии при хранении. В качестве стабилизирующих добавок были изучены следующие вещества: сахароза, желатин и аскорбиновая кислота в различных соотношениях. Для получения посевных культур лактобактерий выращивали в жидкой питательной среде МРС на капустном отваре. Полученную нативную культуру разливали по 50 мл в стеклянные флаконы и добавляли исследуемые стабилизирующие компоненты в различных соотношениях. Все пробы хранили в бытовом холодильнике при температуре (6±2)°С. Один раз в неделю производили высев на плотную питательную среду МРС с целью оценки выживаемости лактобактерий в процессе хранения при добавлении различных стабилизирующих добавок. Всего было исследовано 8 проб. Наибольшую выживаемость в течение шести недель хранения в условиях бытового холодильника обеспечило добавление в культуральную жидкость совместно сахарозы (в конечной концентрации 10%), аскорбиновой кислоты (0,3 %) и желатина (0,3%).

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, лактобактерии, стабилизирующие добавки, посевная культура, выживаемость микроорганизмов.

Пробиотики – препараты на основе живых микроорганизмов, которые улучшают кишечный микробный баланс, обменные и иммунные процессы. Пробиотики созданы на основе видов, входящих в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта животных, поэтому являются безвредными и экологически безопасными. Использование пробиотиков в

питании животных способствует развитию полезной микрофлоры (нормофлоры), которая заселяет желудочно-кишечный тракт и способствует нормализации процессов пищеварения и всасывания питательных веществ [1]. Разработка пробиотических препаратов для ветеринарии является перспективным направлением микробной биотехнологии, но их широкое распространение ограничено стоимостью и высокими требованиями, температурно-временных режимов, которые должны соблюдаться при их транспортировке и хранении.

Для обеспечения высокой выживаемости лактобактерий в процессе хранения при положительных температурах используются разные стабилизирующие добавки. В качестве стабилизирующих добавок нами были изучены следующие вещества: сахароза, желатин, аскорбиновая кислота.

Сахароза – дисахарид, состоящий из остатков фруктозы и глюкозы. Сахароза, используемая в качестве стабилизирующей добавки, способствует установлению баланса с внеклеточной средой, повышает стабильность ферментов, сохраняет метаболическую активность микроорганизмов, а также сохраняет целостность мембраны клеток [2].

Аскорбиновая кислота – бесцветное кристаллическое вещество, без запаха, хорошо растворимое в воде. У животных аскорбиновая кислота выполняет функцию витамина, поэтому некоторые ученые стали искать подобные эффекты и у бактерий. Было показано, что аскорбиновая кислота не оказывает стимулирующего эффекта на рост *Azotobacter chroococcum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella avicida*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus lactis* и *Streptococcus pyogenes*. Были проведены исследования по замене потребностей у микроорганизмов некоторых видов *Lactobacillus* в витамине B12 аскорбиновой кислотой. Было установлено, что витамин B12 лучше заменять аскорбиновой кислотой в культурах, выращенных на питательных средах с ферментативным гидролизатом казеина, но тот же эффект наблюдается и в присутствии цистеина,

тиогликолевой кислоты и глутатиона. Это указывает на то, что аскорбиновая кислота, вероятно, выступает в качестве восстановителя. Было высказано предположение, что аскорбиновая кислота влияет на реактивацию неактивных окисленных фрагментов витамина В12 [3].

Желатин – полимер, продукт расщепления коллагена, в настоящее время не используется в качестве самостоятельного стабилизатора бактериальных суспензий, поскольку не обеспечивает высокую выживаемость бактерий. Его используют совместно с углеводами, что повышает их защитное действие. Протективное действие желатина, вероятно, связано со способностью формировать при замораживании и высушивании аморфную фазу с низкой молекулярной подвижностью [4].

Целью данного исследования является оценка выживаемости бактерий штамма *Lactobacillus paracasei* в нативной культуре в процессе хранения при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$ при добавлении различных стабилизирующих добавок. Объектом исследования является штамм *Lactobacillus paracasei*, выделенный из кишечного содержимого молочного поросенка. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИ Генетики (г. Москва). Данный штамм признан перспективным для включения в состав нового пробиотического препарата ветеринарного назначения, так как обладает высокой антагонистической и адгезивной активностями, высоким уровнем кислотообразования, хорошим потенциалом накопления биомассы, а также устойчивостью к ряду антимикробных препаратов [5].

Культуры лактобактерии выращивали в жидкой питательной среде МРС, приготовленной с использованием капустного отвара. Культуральную жидкость разливали по 50 мл в стеклянные флаконы объемом 100 см³. В каждый флакон с микробной суспензией вносили следующие стабилизирующие добавки в разных сочетаниях: сахарозу, желатин, аскорбиновую кислоту. Сахарозу вносили до конечной концентрации 10%, а аскорбиновую кислоту и желатин до конечной

концентрации 0,3% каждого вещества. В качестве контроля использовали культуральную жидкость без стабилизирующих добавок.

Таблица 1

**Содержание стабилизирующих компонентов
в культуральной жидкости *L. paracasei***

Номер опыта	Добавляемый стабилизирующий компонент...		
	сахароза	желатин	аскорбиновая кислота
1 (контроль)	–	–	–
2	+	–	–
3	+	+	–
4	+	-	+
5	–	+	+
6	–	–	+
7	–	+	–
8	+	+	+

Примечания:
 «-» – стабилизирующий компонент не вносили в культуральную жидкость
 «+» – стабилизирующий компонент добавляли в культуральную жидкость

Флаконы с культуральной жидкостью хранили в условиях бытового холодильника при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$. Через каждые 14 суток культуры высевали на чашки Петри с плотной питательной средой МРС для определения концентрации живых лактобактерий. Срок наблюдения составил 42 дня. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Выживаемость лактобактерий в культуральной жидкости
с различными стабилизирующими добавками в процессе хранения**

Номер опыта	Концентрация живых лактобактерий в культуральной жидкости со стабилизирующими добавками на ... сутки хранения, КОЕ/мл ($X\pm I_{95}$)			
	начало опыта	14	28	42

Биологические науки

1	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(3,1\pm 0,1)\cdot 10^8$	$(1,8\pm 0,1)\cdot 10^6$	$(2,8\pm 0,4)\cdot 10^4$
2	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(5,9\pm 0,8)\cdot 10^7$	$(1,2\pm 0,1)\cdot 10^7$	$(3,5\pm 1,4)\cdot 10^4$
3	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(9,3\pm 0,7)\cdot 10^7$	$(2,9\pm 0,1)\cdot 10^7$	$(5,3\pm 1,7)\cdot 10^4$
4	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(1,0\pm 0,1)\cdot 10^8$	$(3,4\pm 0,1)\cdot 10^7$	$(3,2\pm 0,4)\cdot 10^5$
5	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(1,2\pm 0,1)\cdot 10^8$	$(1,4\pm 0,1)\cdot 10^7$	$(3,0\pm 0,1)\cdot 10^5$
6	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(1,2\pm 0,1)\cdot 10^8$	$(8,2\pm 0,4)\cdot 10^6$	$(8,8\pm 0,7)\cdot 10^5$
7	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(1,7\pm 0,1)\cdot 10^8$	$(2,4\pm 0,1)\cdot 10^6$	$(1,9\pm 0,3)\cdot 10^4$
8	$(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$	$(1,0\pm 0,1)\cdot 10^8$	$(3,4\pm 0,1)\cdot 10^7$	$(2,0\pm 0,1)\cdot 10^6$

Концентрация живых лактобактерий в культуральной жидкости в начале опыта составляла $(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Из представленных в таблице 2 данных следует, что через 14 суток хранения микробных суспензий при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$ концентрация живых лактобацилл во всех суспензиях была практически одинакова. При дальнейшем хранении высокая выживаемость лактобактерий наблюдалась в культуральной жидкости с добавлением аскорбиновой кислоты (опыт 6), а наибольшая выживаемость была отмечена в микробных суспензиях с добавлением трех компонентов: сахарозы, аскорбиновой кислоты и желатина. При исходной концентрации $(1,3\pm 0,6)\cdot 10^9$ КОЕ/мл через 42 дня хранения культуральной жидкости с аскорбиновой кислотой этот показатель составил $(8,8\pm 0,7)\cdot 10^5$ КОЕ/мл, а при хранении культуральной жидкости с добавлением сахарозы, аскорбиновой кислоты и желатина – $(2,0\pm 0,1)\cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Наименьшая выживаемость лактобактерий наблюдалась в культуральной жидкости, в которую был добавлен только желатин. Концентрация живых микроорганизмов в этой суспензии снизилась до $(1,9\pm 0,3)\cdot 10^4$ КОЕ/мл. Это является подтверждением того, что использование желатина в качестве самостоятельного стабилизатора бактериальных суспензий нецелесообразно.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что для обеспечения максимальной выживаемости лактобацилл в культуральной жидкости при хранении при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение шести

недель в качестве стабилизирующих добавок целесообразно добавлять одновременно сахарозу (до конечной концентрации 10%), аскорбиновую кислоту и желатин (до конечной концентрации 0,3% каждого компонента).

Список литературы

1. Соколенко Г. Г., Лазарев Б. П., Миньченко С. В. Пробиотики в рациональном кормлении животных // ТППП АПК. 2015. № 1 (5). С. 72–78.
2. Molina-Hoppner A., Doster W., Vogel R. Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. Vol. 70. № 4. P. 2013–2020.
3. Eddy B. P., Ingram M. Interactions between ascorbic acid and bacteria. *Bacteriol Reviews*. 1953. 17(2). P. 93–107.
4. Грачева И. В., Осин А. В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016. Т. 3. С. 5–12.
5. Шестакова Н. В., Маракулин И. В., Окатова А. В. Биохимические свойства изолятов лактобацилл, выделенных из кишечника поросят-отъемышей // *Общество, наука, инновации: сб. материалов Всерос. ежегод. науч.-практ. конф.* 2014. С. 169–172.

СОРОКОЖЕРДЬЕВА Мария Михайловна – студентка Института биологии и биотехнологии кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: msorokozherdeva@mail.ru

МАРАКУЛИН Игорь Вадимович – доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: biologiavgv@yandex.ru

ПОЗОЛОТИНА Надежда Владимировна – ассистент кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: shnadic@yandex.ru