

ВПЛИВ БІЛКОВО-ВУГЛЕВОДНИХ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ В УМОВАХ СТРЕСОВИХ ТЕМПЕРАТУР

Губар Є.І., Корнієнко І.М.

Державний університет «Київський авіаційний інститут»,
7369819@stud.kai.edu.ua

Abstract

In this study, thermal stress during the drying of lactic acid bacteria LAB cells was investigated using the RV 05 basic 1-B rotary evaporator. The aim of the study was to select protein-carbohydrate protective media for the drying of probiotic cultures (genera Bifidobacterium and Lactobacillus) by evaporation. It was found that the most effective protective media were those supplemented with skim milk and either inulin or lactulose.

Keywords: lactic acid bacteria, viability, protective media.

Вступ. Молочнокислі бактерії (МКБ), неспороутворюючі грампозитивні пробіотичні культури знайшли широке застосування в комплексній терапії певних захворювань, а також, в харчовій промисловості через їхні корисні для здоров'я людини властивості. МКБ виступають у ролі продуцентів таких біологічно активних речовин як: бактеріоцинів, екзополісахаридів, поліолів, органічних кислот, вітамінів [1–3]. Крім того, як пробіотик, МКБ регулюють кишкову біоту, знижують рівень холестерину, покращують імунітет людини, також, впливають на метаболічну активність. Більшість МКБ стикаються з різними абіотичними та біотичними стресами (наприклад, кислотними, термічними, осмотичними, окиснювальними та іншими), які в подальшому впливають на їх активність, життєздатність та ефективність виробництва функціональних продуктів харчування.

Резистентність МКБ до стресових факторів – це явище, яке зазвичай існує у даних бактерій, оскільки надає їм певну толерантність до суворих умов завдяки наявності природних адаптаційних механізмів. Біотехнологія отримання пробіотичних препаратів передбачає такі технологічні етапи як: ферментація поживного середовища та отримання клітинної біомаси МКБ, використання фізичних (температурних) факторів впливу на анабіотичний стан МКБ задля збереження їх властивостей та життєздатності після активації в технології виробництва біопрепаратів або функціональних продуктів харчування, в яких використовуються заквасочні культури МКБ. Частіше за все, в технології висушування пробіотичних культур використовують такі типи сушарок: сублімаційна, вакуумна, розпилювальна, барабанна [4].

Враховуючі актуальність питання щодо впливу вище зазначених стресових факторів на активність МКБ, нами проведено дослідження, направлене на виявлення оптимального білково-вуглеводного захисного середовища (інуліну, фруктози та лактулози) для пробіотичних культур (родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*), яке рекомендовано до використання в процесі сушіння біомаси МКБ із застосуванням лабораторного випарника ротаційного RV 05 basic 1-B.

Матеріали та методи. Для культивування МКБ нами було використано рідке поживне середовище на основі молочної сироватки (молочна сироватка –

100 мл; голюкоза – 10 г; дистильована вода до 1 л) із додаванням вуглеводних захисних середовищ різних концентрацій. Усі поживні середовища підлягали стерилізації в автоклаві при тиску 1,1 атм. Культивування досліджуваних пробіотичних культур до випарювання проводили шляхом їх вирощування у рідкому середовищі за умови періодичного культивування протягом 24 годин з послідовним концентруванням на центрифугі Sigma 1–16 при 1000 об./хв. протягом 7 хв. Отриманий концентрат МКБ (суспензію) змішували із стерильним захисним середовищем, розливали порціями у стерильні колби із ковпачками, потім відбувався процес висушування методом випарювання на лабораторній установці (рис. 1).



А



Б

Рис. 1. Лабораторна установка: а - випарник ротаційний RV 05 basic 1-В, б - результат висушування пробіотичних культур на прикладі додавання інуліну та сухого молока.

Культивування МКБ відбувалося в термостатних умовах при температурі 37 °С протягом 1 доби. Після культивування МКБ, до складу суспензії було додано захисні компоненти – розчин сухого молока у концентрації 30 % (у кожний зразок) і інулін, фруктоза та лактулоза у концентрації 10 % відповідно. Після чого культури піддавалися висушуванню на ротаційному випарнику (технічні характеристики наведені у табл. 1).

Таблиця 1. Технічна характеристика випарника ротаційного RV 05 basic 1-В.

Тип холодильника	діагональний
Охолодна поверхня (поверхня теплообміну)	1200 см ²
Потужність випарника	1000 мл/год
Діапазон швидкостей	46-260 об/хв
Максимальне навантаження	10 кг
Потужність нагріву водяної бані	1000 Вт
Точність регулювання температури	±5 °С
Температура під час експерименту	70 °С
Габаритні розміри	520x450x900 мм
Вага	12 кг
Напруга	220В

Кількість клітин встановлено за допомогою денситометру типу DEN-1. Визначення кількості клітин МКБ, загинувших під час сушіння методом випарювання, рахували за формулами:

$$N_1 = \frac{lgKYO_2 \times 100}{lgKYO_1}$$

$$N_2 = 100 - N_1,$$

де N_1 – кількість життєздатних клітин МКБ, що залишилися, %; $lgKYO_2$ – кількість клітин МКБ у зразку після випарювання; $lgKYO_1$ – кількість клітин МКБ в 1 г сирової біомаси після центрифугування; N_2 – кількість клітин МКБ, загинувших під час сушіння методом випарювання, % [5].

Для вивчення морфологічних властивостей МКБ та їх ідентифікації, було використано метод фарбування клітин метиленовим синім [6].

Усі дослідження проведено в трикратній повторюваності із визначенням середнього значення.

Результати та обговорення. Результати визначення впливу захисних середовищ на титр життєздатних клітин МКБ до висушування та після висушування на лабораторному ротаційному випарнику представлено в табл. 2.

Найкращим серед досліджених захисних середовищ є 1 та 3 зразки.

Таблиця 2. Збереження життєздатності термофільних МКБ до та після висушування методом випарювання.

	Кількість клітин МКБ до сушіння (суспензія), lg KYO/см ³	Кількість клітин МКБ після сушіння, lg KYO/см ³	Кількість загинувших клітин МКБ після сушіння, %	Рівень збереження життєздатності, %
Сухе молоко (30 %) + інулін (10 %)	9,0	7,3	18,8	Середній
Сухе молоко (30 %) + фруктоза (10 %)	9,0	6,5	27,7	Низький
Сухе молоко (30 %) + лактулоза (10 %)	9,0	7,2	20	Середній

Отримані результати досліджень порівняно із іншими науковими роботами. Встановлено, що авторами [7] проведено дослідження щодо виявлення найефективніших захисних речовин для підвищення життєздатності певних штамів молочнокислих бактерій — *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CICC 6097, *Lactiplantibacillus plantarum* CICC 21839, *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Оцінку їх ефективності визначали шляхом порівняння їхньої ферментативної активності після сушіння розпиленням (температура на вході/виході: 135 °C / 90 °C). В ході роботи було створено чотири комбіновані захисні суміші, кожна з яких містила 10% знежиреного молока та одну з добавок: натрієву сіль глютамінової кислоти, сахарозу, трегалозу або комбінацію натрієвої солі глютамінової кислоти, сахарози й трегалози. При додаванні захисних компонентів кількість життєздатних клітин, досліджених штамів МКБ,

коливалася в межах $lg\ 8,56-9,0\ КУО/см^3$, що в повній мірі співвідноситься із даними, наведеним в табл. 2. На рис. 2 представлено результат мікроскопії життєздатних клітин МКБ після висушування з використанням ротаційного випарника.

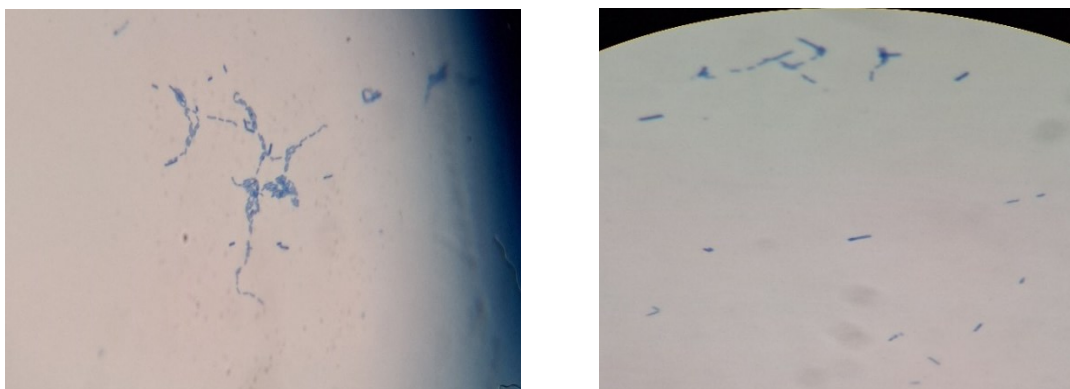


Рис. 2. Клітини МКБ (родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) під мікроскопом (x1000, мікроскоп біологічний XS-2610 LED MICROmed).

Висновки. Пробиотики повинні завжди зберігати свою життєздатність і функціональність у процесі виробництва, зберігання та використання за призначенням, щоб забезпечити належну якість під час їх застосування. Умови виробництва, особливо висушування суспензії МКБ, повинно відбуватися із використанням захисних середовищ, які підбираються в залежності від типу сушіння, температури та особливостей культури.

Список використаної літератури:

1. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria / S. da Silva Sabo et al. *Food research international*. 2014. Vol. 64. P. 527–536. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>.
2. Polyol-producing lactic acid bacteria isolated from sourdough and their application to reduce sugar in a quinoa-based milk substitute / S. Jeske et al. *International journal of food microbiology*. 2018. Vol. 286. P. 31–36. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.013>.
3. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective / J. G. LeBlanc et al. *Current opinion in biotechnology*. 2013. Vol. 24, no. 2. P. 160–168. URL: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>.
4. Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology progress*. 2007. Vol. 23, no. 2. P. 302–315. URL: <https://doi.org/10.1021/bp060268f>.
5. Tsisaryk O. I., Slyvka I. M., Musiy L. I. Дослідження впливу складу захисного середовища на збереження життєздатності ліофілізованих бактерій *L. lactis* та *L. plantarum*, виділених із традиційної карпатської бринзи. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies*. 2017. Т. 19, № 75. С. 29–34. URL: <https://doi.org/10.15421/nvlvet7506>.
6. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум / уклад.: Л. С. Ястремська, І. М. Малиновська, Н. А. Зінов'єва. К.: НАУ, 2017. – 120 с.
7. Screening the protective agents able to improve the survival of lactic acid bacteria strains subjected to spray drying using several key enzymes responsible for carbohydrate utilization / J. Liu et al. *Microorganisms*. 2024. Vol. 12, no. 6. P. 1094. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061094>.