

(профилактика и терапия)/. Ветеринария.- 2010.-№11.-С.35-37

13.Пудовкин Д.Н. /Новое в генезе мастита коров/. Молочное и мясное скотоводство/. 2020, №3, С.43-45

14.Целуева Н.И. диссертация на соискание ученой кандидата ветеринарных наук/Анализ изменений эпизоотической обстановки по важнейшим зооантропо-

зам в Смоленской области / Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. Москва, 2006.

15.Шахов А.Г., Минсайлов В.Д., Нежданов А.Г., Париков В.А., Притыкин Н.В., Слободяник В.И. /Неотложные задачи профилактики мастита у коров/ Ветеринария. -2005.-№ 8.-С.3 - 7.

УДК 579.8:542.496:636.087

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.1.69

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОСЛЕ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШКИ

Явников Н.В., канд. вет. н., доц. каф. незаразной патологии
ФГБОУ ВО Белгородский ГАУ

Ключевые слова: лактобактерии, бифидобактерии, лиофильная сушка, криопротекторы. **Keywords:** lactobacilli, bifidobacteria, freeze drying, cryoprotectors.



РЕФЕРАТ

В данном исследовании было определено влияние различных криопротекторов на жизнеспособность консорциума пробиотических микроорганизмов *Lactobacillus plantarum* 8 β и *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β после проведения лиофильной сушки. Данные штаммы являются производственными и используются для приготовления кормовых добавок. Всего было испытано 6 различных вариантов защитных сред. Основой всех апробированных криопротекторных сред являлось обезжиренное молоко в количестве 10 %, в качестве криопротекторов также использовали сахарозу, лактозу и SiO₂, которые добавляли к обезжиренному молоку в различных комбинациях. Леофильная сушка проводилась по стандартной методике, с предварительной заморозкой образцов в криостате до минус 72 оС, процесс лиофилизации длился 26 часов, во время которого показатель вакуума изменяли от 40 Па до 4 Па, а температуру повышали до 28 °С. Влияние защитной среды на выживаемость пробиотических микроорганизмов определяли путём посевов серийных разведений культур на агар МРС-4, инкубация при 37 °С в течение 48 часов, с последующим подсчётом колоний. Посевы производили перед процедурой сушки (количество колоний принимали за 100 %) и сразу после. Наиболее высокие показатели выживаемости пробиотических бактерий были получены с применением защитной среды на основе 10 % обезжиренного молока и 10 % обезжиренного молока с добавлением 2 % SiO₂, и составили 81,84 % и 82,48 % соответственно. Влажность образцов после высушивания составила: среда на основе 10 % обезжиренного молока - 4,40 %; 10 % обезжиренного молока плюс 2 % SiO₂ - 4,93 %. Такая влажность для лиофильных препаратов данных бактерий является оптимальной, и способствует длительному хранению образцов с сохранением жизнеспособности.

ВВЕДЕНИЕ

Лиофильная сушка (сублимация) является одним из самых распространённых технологических приёмов по стабилизации пробиотических микробиологических препаратов. Данная технология применяется как для обеспечения длительного хранения необходимых штаммов, так и для изготовления удобных в применении форм пробиотических препаратов. Благодаря использованию лиофилизации сухие бактериальные препараты находят всё более широкое применение. В то же время вопросы технологии высушивания, состава защитных сред и последующего досушивания препаратов разными авторами трактуются по-разному. Это связано с биологическими особенностями конкретных микроорганизмов, условиями сублимации, с другими технологическими процессами, которые могут влиять на качество препарата. Довольно много вопросов возникает и при лиофильной сушке новых пробиотиков, содержащих молочнокислые бактерии [1-4].

Учитывая вышеизложенное, целью нашей работы было конструирование защитной среды, которое бы позволяло максимально сохранить молочнокислые бактерии в процессе сублимации, а также подобрать оптимальный режим лиофильной сушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для конструирования пробиотиков из микроорганизмов *Lactobacillus plantarum* 8 β, *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β методом лиофильной сушки, была разработана технология [2, 8], которая включает следующие основные этапы:

- получение бактериальной массы лакто- и бифидобактерий для приготовления пробиотиков;
- разработка оптимальной защитной стабилизирующей среды для молочнокислых бактерий;
- отработка режима лиофильного высушивания штаммов *Lactobacillus plantarum* 8 β, *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β;
- контроль физиолого-биохимических свойств производственных штаммов по

показателям качества: внешний вид, контаминация посторонней бактериальной и грибковой микрофлоры, типичность культур, количество живых микробных клеток в 1 см³ высушенного препарата, активность свертывания молока.

На питательной среде КДС (казеиново-дрожжевая среда) была накоплена бактериальная масса путём совместного культивирования производственных штаммов *Lactobacillus plantarum* 8 β и *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β.

Культуральную среду центрифугировали при 6000 об/мин 20 минут (центрифуга 5920R, Eppendorf), надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (pH 6,5) до 10% от первоначального объёма. В данную суспензию вносили вещества (криопротекторы) для определения их защитных свойств на микроорганизмы при лиофилизации, а суспензию без добавления криопротекторов использовали как контроль. В качестве криопротекторов использовали: обезжиренное молоко, лактозу, сахарозу и диоксид кремния пищевой (пищевая добавка E 551, химическая формула SiO₂), таблица 1. Бактериальную суспензию в стерильных условиях разливали по 5 см³ в пенициллиновые флаконы объёмом 10 см³ и замораживали до 72 °С (морозильный шкаф Frigera HC 280/75, Eppendorf). Лиофильное высушивание было проведено на установке LZ-9.2. Процесс сушки продолжался 26 часов, температура от минус 72 °С до 28 °С, вакуум от 40 Па до 4 Па.

После высушивания флаконы оценивались визуально, стерильно укупоривались и помещались для хранения в бытовой холодильник (6±2 °С). Для дальнейших исследований было отобрано по 3 флакона из каждого варианта защитной среды.

Исследования проводили по таким показателям: остаточная влажность, (определяли сушкой препаратов в сушильном шкафу при 120 °С) и выживаемость бактерий. Для этого жизнеспособные клетки подсчитывали перед сушкой (начальные показатели) и сразу после

Таблица 1

Состав защитных сред для лиофилизации молочнокислых бактерий

№ защитной среды	Состав
1	Обезжиренное молоко 10 %
2	Обезжиренное молоко 10 % + лактоза 5 %
3	Обезжиренное молоко 10 % + сахароза 5 %
4	Обезжиренное молоко 10 % + SiO ₂ 2 %
5	Обезжиренное молоко 10 %+ лактоза 5 % + SiO ₂ 2 %
6	Обезжиренное молоко 10 % +сахароза 5 % + SiO ₂ 2 %
Контроль	Фосфатно-солевой буфер

Таблица 2

Выживаемость бактерий и влажность препаратов (M ± m, n = 3)

№ защитной среды	Выживание, %	Влажность, %
1	81,84	4,40 ±0,10
2	78,21	4,70 ±0,10
3	76,92	4,85 ±0,48
4	82,48	4,93 ±0,15
5	77,99	5,12 ±0,08
6	77,56	5,42 ±0,20
Контроль	22,65	1,23 ±0,10

процесса сушки. Показатель после сушки делили на первоначальную концентрацию и умножали на 100. Серийные разведения каждого образца делали с использованием 0,1 % стерильной пептонной воды и высевали на агаре МРС-4 в двух экземплярах. Инкубировали при 37 °С в течение 48 часов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Перед лиофильной сушкой среднее содержание живых микроорганизмов в суспензии составляло $7,8 \pm 0,25 \times 10^9$ КОЕ, в процессе лиофилизации жизнеспособность снизилась, наиболее значительно в контроле, таблица 2. В процессе лиофилизации наблюдалось снижение жизнеспособности молочнокислых бактерий. Наиболее значительное, до 22,65 %, снижение произошло в контрольной группе. В образцах с добавлением криопротекторов процент выживания бактерий был значительно выше и составлял от 76,92 % до 82,48 %. Наиболее высокие значения выживаемости бактерий были отмечены в защитных средах без дополнительного введения сахаров. Выживаемость бакте-

рий составила 81,84 % с применением защитной среды на основе 10 % обезжиренного молока и 82,48 % с использованием в качестве криопротекторов 10% обезжиренного молока с добавлением 2 % SiO₂. Влажность лиофильных препаратов с добавлением криопротекторов в среднем составляла от 4,40 до 5,42 %. Зависимости выживаемости бактерий от влажности препаратов не было обнаружено, но следует отметить, что наибольшая влажность была выявлена в тех препаратах, в защитные среды которых добавляли SiO₂. Наименьшая влажность выявлена в контрольных образцах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, во время сушки, в том числе лиофильной, организмы подвергаются различным клеточным стрессам, которые могут привести к повреждению или даже к гибели клеток. Выживание высушенных микроорганизмов зависит от множества факторов: штамм, метод сушки и его режим, состав защитной среды. Лيوфилизация может приводить к потере жизнеспособности клеток из-за таких

факторов, как денатурация чувствительных белков, образование внутриклеточных кристаллов льда, повреждение клеточных мембран, вызванное высокими концентрациями внутренних растворенных веществ. Согласно литературным данным [5-6] маленькие сферические клетки более устойчивы к сублимационной сушке, чем палочки. Поэтому для бифидобактерий и лактобацилл вид и количество криопротекторов в защитной среде имеет важнейшее значение. В наших исследованиях были протестированы различные протекторы для повышения стабильности микроорганизмов во время сублимационной сушки.

Одним из наиболее распространенных криопротекторов является обезжиренное молоко. Также многие исследования показывают необходимость добавлять сахара для ингибирования образования свободных радикалов [7]. Сахара увеличивают стабильность клеточного белка, образуя с ним водородные связи, тем самым снижая риск воздействия окружающей среды [8]. Кроме того, сахарам присуща не высокая стоимость, что позволяет значительно удешевить себестоимость конечной продукции. Диоксид кремния обладает высокими гидрофильными свойствами, нетоксичен, благодаря чему широко используется как пищевая добавка. Также использование SiO_2 позволяет предотвращать слипание и слеживание сухой биомассы бактериальных клеток и увеличивать срок хранения готового продукта. В данном исследовании не наблюдалось увеличения выживаемости лакто- и бифидобактерий при использовании различных комбинаций обезжиренного молока и сахаров. Это может быть связано с тем, что содержащиеся в молоке белки и лактоза, обеспечивают необходимую защиту данных штаммов. Наивысшая активность микроорганизмов выявлена при применении таких криопротективных компонентов как 10 % обезжиренное молоко и 10 % обезжиренное молоко плюс 2 % SiO_2 .

Содержание влаги в лиофилизированном порошке с добавлением криопротек-

торов составляло, в среднем, от 4,40 % до 5,42 % (табл. 2). Лиофильная сушка вызывает удаление трех типов клеточной воды: свободной, промежуточной и структурированной. Поэтому чрезмерное высушивание может повредить клеточные белки и быть вредным для выживания организмов. Согласно данным исследователей [6] оптимальное содержание влаги для лиофилизата лактобактерий варьирует от 2,80 % до 5,60 %. Среднее содержание влаги в образцах с добавлением 10 % обезжиренного молока и добавлением 10 % обезжиренного молока плюс 2 % SiO_2 , составляет 4,40 % и 4,93 % соответственно. Таким образом влажность лиофилизатов находится в допустимых пределах (см. табл. 2).

ВЫВОДЫ

Применение 10 % обезжиренного молока обеспечивает высокие защитные свойства при лиофильном высушивании штаммов *Lactobacillus plantarum* 8 β и *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β . Добавление к защитной среде на основе обезжиренного молока 2 % диоксида кремния повышает её криопротекторные свойства.

THE EFFECT OF VARIOUS CRYOPROTECTIVE COMPONENTS ON THE SURVIVAL OF PROBIOTIC MICROORGANISMS AFTER FREEZE DRYING. Nazar V. Yavnikov, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Non-infectious Pathology Chair.

ABSTRACT

In this study, the influence of various cryoprotectants on the viability of the consortium of probiotic microorganisms *Lactobacillus plantarum* 8 β and *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β after the lyophilic drying. These strains are manufacturing strains and are used for preparing feed additives. A total of 6 different protective environments were tested. The basis of all tested cryoprotector media was skimmed milk in a quantity of 10%, as cryoprotectants also used sucrose, lactose and SiO_2 , which were added to the skimmed milk in various combinations. Lyophilic drying was carried out according to standard procedure, with preliminary freezing of samples in cryostat up to minus 72

оС, the lyophilization process lasted 26 hours, during which the vacuum index varied from 40 Pa to 4 Pa, The temperature was raised to 28 оС. The effect of the protective medium on the survival of probiotic microorganisms was determined by planting a series of crops on agar MRS-4, incubation at 37 C in 48 hours, and then counting the colonies. Crops were produced before the drying procedure (the number of colonies was 100%) and immediately after. The highest survival rates of probiotic bacteria were obtained using a protective medium based on 10% skimmed milk and 10% skimmed milk with 2% SiO₂ added, accounting for 81.84% and 82.48% respectively. The moisture content of the samples after drying was as follows: Medium based on 10% skimmed milk - 4.40%; 10% of skimmed milk plus 2% SiO₂ - 4.93%. This humidity for lyophilic preparations of these bacteria is optimal, and promotes long-term storage of samples with continued viability.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред / И.В. Грачева, А.В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 3. С. 5-12
- 2.Явников Н.В. Изучение антагонистической активности штаммов лактобактерий и бифидобактерий против возбудителей маститов у коров / Н.В. Явников, А.В. Ткачев // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. – 2021. - № 1 (62). – С. 76-82.
- 3.Коваленко А.М. Антимикробная и обез-

боливающая активность нового экспериментального препарата на основе наносеребра для лечения маститов крупного рогатого скота / А.М. Коваленко, А.В. Ткачев, О.Л. Ткачёва, Т.В. Зубова, В.А. Плешков, О.В. Смоловская // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2019. – № 11 (181). – С. 84-98.

- 4.Костюк А.Д. Молекулярно-генетическая оценка устойчивости коров к маститам / А.Д. Костюк, А.В. Ткачев // В книге: Горинские чтения. Инновационные решения для АПК. Материалы Международной студенческой научной конференции. В 4-х томах. - 2020. - С. 32.

- 5.Yong HL, Marc BB, Tahir N, Quader A, Gary PM. Effects of Sucrose and Trehalose on the Preservation of the Native Structure of Spray-Dried Lysozyme. *Pharmaceutical Research*. 2004; 9(12):1847–53.

- 6.Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61:3592–7.

- 7.Champagne CF, Gardner N, Brochu E, Beaulieu Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 1991; 24:118–28.

- 8.Thammavongs B, Corroler D, Panoff JM, Auffray Y, Boutibonnes P. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/ thawing challenge. *Letters in Applied Microbiology*. 1996; 23:398–402.