ПРОБЛЕМИ БІОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 576.8.52 579.083.13

О.В. Акулевич, Л.Б. Орябінська, О.М. Дуган

КІНЕТИКА РОСТУ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS* НА ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ З РІЗНОМАНІТНИМИ ДЖЕРЕЛАМИ ВУГЛЕЦЕВОГО Й АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ

The study assesses the possibility of using biotechnology probiotic soy and glucose-pyruvate culture media, which contain different sources of carbon and nitrogen. When choosing nutrient media, we take into account the end product cost, which can be reduced by decreasing the cost of medic components and simplifying its preparation. We investigate five strains of lactic acid bacteria p. *Lactobacillus* serving the basis of a new probiotic. We propose the media composition based on soy milk and determine the optimal growth condition of lactobacterium: cultivation temperature – 37 °C, the inoculum dose to the medium volume – 5 %, pH – 7,0. The soy medium provides a high level of biomass accumulation of lactic acid bacteria. Therefore, it can be effectively used in the technology of food additives and food functionality products, containing the lactic acid bacteria genus *Lactobacillus.*

Вступ

Одним із основних факторів, який визначає можливість виробничого виготовлення мікробіологічних препаратів, є підбір живильного середовища з урахуванням фізіологічних потреб відібраних штамів бактерій, їх біосинтетичної активності, вартості компонентів середовища та стабільності готового препарату [1]. Лактобактерії є ауксотрофними організмами і тому надзвичайно вибагливі до штучних живильних середовищ [2].

На сьогодні оптимальним для культивування лактобактерій є середовище MRS [1, 3]. Але на стадії основного технологічного процесу отримання пробіотика – виробничого культивування, використання складного і вартісного живильного середовища є економічно недоцільним, особливо у випадку отримання харчових домішок і продуктів функціонального призначення. Тому виникає нагальна потреба у здешевленні існуючих технологій вирощування пробіотичних мікроорганізмів за рахунок введення в практику виробництва нових фізіологічно ефективних і дешевих живильних середовищ.

Постановка задачі

Дослідження спрямоване на оцінювання можливості використання соєвого та глюкозо-піруватного живильних середовищ для вирощування лактобактерій у біотехнології пробіотиків.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були 5 штамів базової композиції пробіотика бактерій роду *Lactobacillus,* які отримані з музею культур кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки НТУУ "КПІ". Походження штамів наведено в табл. 1.

***Таблиця* 1.** Пробіотичні мікроорганізми

Назва штаму	Походження
L. delbrueckii subsp. bulgaricus LB86 ВКПМ-В-5788	Завод біо- та ферментних препаратів "Ензим"
L. delbrueckii subsp.delbrueckii DSM20074	Німецька колекція DSMZ
L. rhamnosus LB3 IMB B-7038	Некомерційні молочно-кислі продукти *
L. acidophilus ©	Некомерційні молочно-кислі продукти *
L. rhamnosus V ®	Pure Research Products, Colorado, USA

Для вирощування мікроорганізмів використовували середовища з різними джерелами вуглецевого й азотного живлення: основне середовище MRS (джерело вуглецю – глюкоза, джерело азоту – пептон ферментативний, м'ясний бульйон, цитрат амонію) [1] та два альтернативні – глюкозо-піруватне середовище (джерело вуглецю – глюкоза та піруват натрію, джерело азоту – цитрат амонію) і середовище на основі соєвого борошна (джерело вуглецю – глюкоза та сахароза, джерело азоту – амінокислоти соєвого білка). Живильне середовище на основі соєвого борошна готувалось за способом, вибраним з літературних даних та модифікованим для можливості відтворення в лабораторних умовах [2]. Компонентний склад

глюкозо-піруватного середовища використовували згідно з [3]. Культивування лактобактерій проводили глибинним способом у термостаті (ТС-80М-2) за 37 °С протягом 24 год. Концентрація клітин бактерій у посівному матеріалі становила 10^9 КУО/мл. Вимірювання pH живильного середовища проводили на pH-метрі pH-150. Коригування pH здійснювали за допомогою 30 %-ного NaOH. Вплив pH на ріст пробіотичних штамів при їх розвитку на живильному середовищі визначали за врожаєм культури в кінці культивування. Оптичну густину культур вимірювали на КФК-3-01 при λ = = 540 нм і товщині кювети 1,0 см. Відсоток життєздатних клітин визначали за допомогою висіву відповідних розведень культуральної рідини на агаризоване (щільне) середовище MRS з подальшим встановленням кількості колонієутворювальних одиниць (КУО) в 1 мл суспензії. Усі досліди проводили не менш ніж у 3-х повторах із використанням відповідних контролів. Цифрові дані, отримані в результаті досліджень, оброблювалися статистичними методами з використанням *t*-критерію Стьюдента для малих вибірок на 95–99 % рівні значимості [4].

Результати і їх обговорення

При виборі живильних середовищ керувались показником собівартості готової продукції, яка може бути зменшена за рахунок зниження вартості компонентів середовища або спрощення його підготовки. Так, глюкозо-піруватне живильне середовище технологічніше, ніж MRS, з економічної точки зору, оскільки потребує пастеризації за температури 90 °С протягом 20 хв. Це дає можливість зменшити витрати електроенергії і води, а також тривалість і трудомісткість приготування запропонованого середовища.

Соєве молоко, на основі якого готується соевоє середовище, є продуктом з високим вмістом білка, в якому встановлено наявність 17 амінокислот, з яких 7 незамінних. Воно містить в оптимальних дозах всі необхідни вітаміни (K, E, A, D, C, B_1, B_2, B_6, B_{12}, PP, фолієву та пантотенову кислоти, холін, інозит), мінеральні речовини (K, Ca, P, Mg, Na) та мікроелементи (Fe, Zn, Cu, Mn, F, I, а в дяких випадках і Se). Вуглеводи представлені у вигляді сахарози (98 %) та рафінози. Соєве молоко не містить лактозу і холестерин [5]. Серед рослинних білків соєвий білок є найбільш близьким за складом і технологічними властивостями до молочного білка. Крім того, він забезпечує високі антагоністичну та імуномодулюючу властивості штамів роду *Lactobacillus* [6].

Для подальших досліджень було вибрано дешеве соєве живильне середовище, яке збагачене джерелом вуглецевого живлення – глюкозою. Для порівняння ефективності накопичення пробіотичної біомаси лактобактерій на альтернативних середовищах було розглянуто динаміку розвитку культур виробничих штамів на стандартному живильному середовищі MRS за попередньо визначених оптимальних умов (доза посівного матеріалу 10 %, pH 6,5, *t* – 37 °С) [7] (рис. 1).

Як видно з рис. 1, для кожної з культур лактобактерій протягом 12-13 год спостерігається експоненціальна фаза розвитку, коли популяція клітин перебуває в умовах збалансованого росту. З 12-13-ї год культури виходять на стаціонарну фазу та досягають максимального рівня накопичення біомаси.

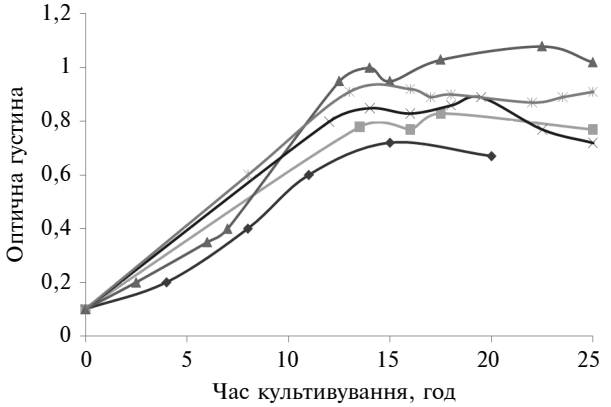

Рис. 1. Динаміка розвитку культур лактобактерій на МРС: – *L. Rhamonus*®; – *L. Acidofilus*©; – *L. Rhamonus LB IMB B-7038*; – *L. Delbrueckii subsp. Delbrueckii*; – *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus LB86 ВКПМ-В-5788*

Для об'єктивного оцінювання ефективності використання соєвого живильного середовища були вивчені оптимальні умови культивування лактобактерій – показники значення pH середовища та доза посівного матеріалу. Як видно з табл. 2, оптимум початкових значень pH, що забезпечує максимальний вихід біомаси лактобактерій на соєвому середовищі, перебуває в межах 6,5–7,0. При вихідному значенні pH 8,0 розвиток культури практично припинявся. В подальших дослідженнях для культивування штамів лактобактерій використовували соєве середовище із значенням pH 7,0.

***Таблиця* 2.** Вплив вихідного значення pH живильного соєвого середовища на ріст *L. rhamnosus LB3*

Початкове значення pH	Кількість клітин, $\times 10^8$ кл/мл	
	M ± м	Відсоток від максимуму
5,5	2,75 ± 0,03	55,4
6,0	2,88 ± 0,23	58,1
6,5	4,75 ± 0,035	95,8
7,0	4,96 ± 0,26	100
7,5	4,50 ± 0,21	90
8,0	0,10 ± 0,045	2

Примітка. Результати наведені для одного з робочих штамів, оскільки проявлялась однакова тенденція для всіх досліджуваних культур.

Відомо, що в умовах періодичного культивування доза посівного матеріалу впливає на швидкість накопичення біомаси та забезпечує високий економічний коефіцієнт. Вплив дози посівного матеріалу на вихід біомаси при культивуванні лактобактерій на соєвому живильному середовищі відображено на рис. 2. Як видно, при вирощуванні культури *L. rhamnosus LB3* на соєвому живильному середовищі протягом 24 год вихід біомаси при внесенні 5 і 10 %-ної дози посівного матеріалу має несуттєві відмінності. Тому як оптимальна доза посівного матеріалу при вирощуванні культури на соєвому живильному середовищі була вибрана більш економічна доза 5 % від об'єму живильного середовища.

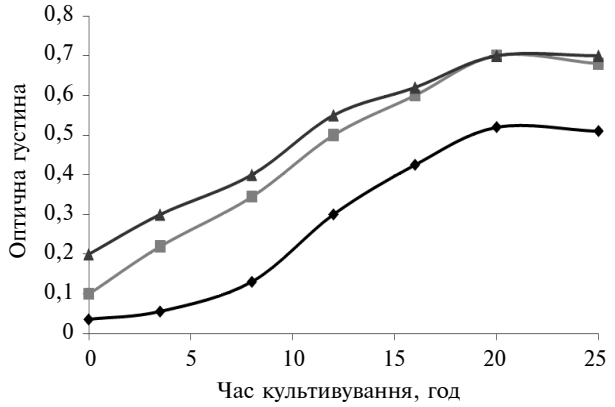

Рис. 2. Вплив дози посівного матеріалу на ріст *L. rhamnosus LB3* при культивуванні на соєвому живильному середовищі: — 2,5 %; — 5 %; — 10 % (результати наведені для одного з робочих штамів *L. rhamnosus LB3*, оскільки проявлялась однакова тенденція для всіх досліджуваних культур)

Динаміку розвитку культур 5 пробіотичних штамів на соєвому живильному середовищі за оптимальних умов (pH 7,0 і дози посівного матеріалу 5 %) наведено на рис. 3.

Соєве середовище забезпечувало високий рівень накопичення біомаси більшості використаних штамів лактобактерій, крім *L. delbrueckii subsp.delbrueckii*. Таким чином, середовище на основі соєвого молока може бути використане в промисловості при культивуванні молочнокислих бактерій, але потребує попереднього вивчення індивідуальних поживчих потреб різноманітних штамів бактерій.

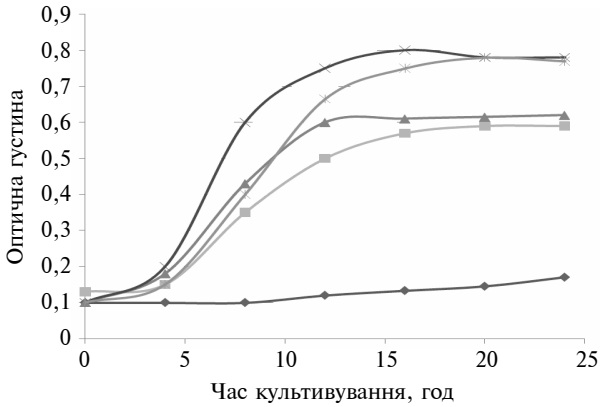

Рис. 3. Динаміка розвитку виробничих штамів на соєвому живильному середовищі (pH 7,0, доза посівного матеріалу 5 %): — *L. Delbrueckii subsp. Delbrueckii*; — *L. acidophilus*©; — *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*; — *L. rhamonus LB-3*; — *L. rhamonus V*

При підборі живильного середовища для молочнокислих бактерій багато досліджень спрямовано на пошук оптимального джерела вуглецевого живлення мікроорганізмів. Наведені в літературі дані свідчать, що кометаболізм глюкози та пірувату підвищує ростову активність деяких молочнокислих бактерій [8]. З метою встановлення оптимальних умов культивування лактобактерій на глюкозо-піруватному живильному середовищі, в якому як джерело вуглецю використовували піруват натрію і глюкозу, а як джерело азотного харчування – цитрат амонію, було проведено дослідження впливу pH (рис. 4) і дози посівного матеріалу (рис. 5) на розвиток культури маркерного штаму *L. rhamnosus LB3*. На рис. 4 і 5 результати подані для одного з робочих штамів, оскільки проявлялась однакова тенденція для всіх досліджуваних культур.

Як видно з рис. 4, спостерігається чітка залежність інтенсивності накопичення біомаси культурою *L. rhamnosus LB3* на глюкозо-піруватному живильному середовищі від значення pH. За результатами експерименту, підтримання pH на постійному рівні 6,0 дає змогу вже на

21–24 год культивування досягти максимального накопичення біомаси лактобактерій.

Залежність інтенсивності розвитку культури на глюкозо-піруватному живильному середовищі від внесеної кількості посівного матеріалу при pH 6,0 показано на рис. 5.

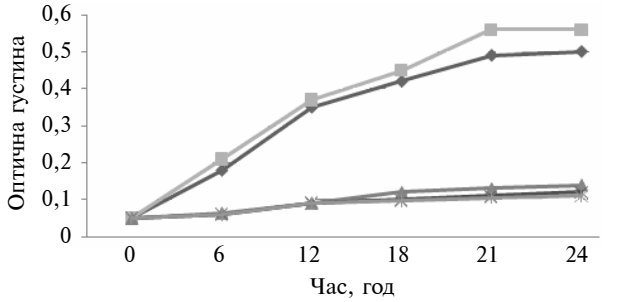

Рис. 4. Вплив pH глюкозо-піруватного живильного середовища на ріст *L. rhamnosus LB3*: – pH 4,5, – pH 5,0, – pH 5,5, – pH 6,0, – pH 6,5 (результати наведені для одного з робочих штамів *L. rhamnosus LB3*, оскільки проявлялась однакова тенденція для всіх досліджуваних культур)

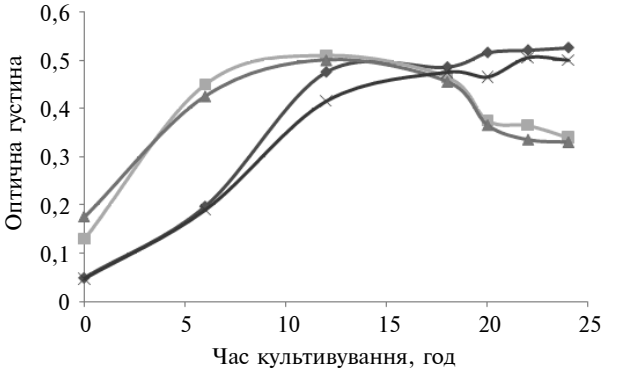

Рис. 5. Вплив дози посівного матеріалу на ріст *L. rhamnosus LB3* при культивуванні на глюкозо-піруватному живильному середовищі (pH 6,0): – 2,0 %, – 2,5 %, – 5,0 %, – 10,0 % (результати наведені для одного з робочих штамів *L. rhamnosus LB3*, оскільки проявлялась однакова тенденція для всіх досліджуваних культур)

Отримані результати свідчать, що при вирощуванні досліджуваних штамів на глюкозо-піруватному живильному середовищі доцільно брати 2,5 %-ну дозу посівного матеріалу від об'єму культуральної рідини. Підвищення її до 5 % не призводить до більш інтенсивного росту лактобактерій, оскільки підвищується конкуренція за джерела живлення та прискорюється інтоксикація клітин, що зумовлена продуктами їх розпаду.

Отже, за оптимальні умови культивування лактобактерій на глюкозо-піруватному середовищі покладаються pH 6,0 і доза посівного матеріалу 2,5 %. Динаміка розвитку 5-ти штамів базової композиції на глюкозо-піруватному живильному середовищі за оптимальних умов відображена на рис. 6.

Як видно з рис. 6, характер розвитку культур майже однаковий, але глюкозо-піруватне живильне середовище не забезпечує високого рівня розвитку вибраних штамів. Оптична густина в процесі культивування штамів варіювала на рівні 0,34–0,47 одиниць.

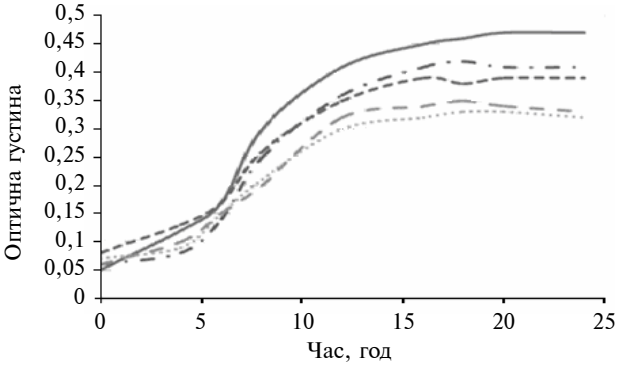

Рис. 6. Динаміка розвитку культур виробничих штамів на глюкозо-піруватному живильному середовищі (pH 6,0, доза посівного матеріалу 2,5 %): – *L. rhamnosus LB3*; – *L. rhamnosus V®*; – *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*; – *L. delbrueckii subsp.delbrueckii*; – *L. acidophilus* ©

Аналіз вибраних альтернативних живильних середовищ зі стандартним середовищем MRS для культивування лактобактерій проводився порівнянням показників інтенсивності накопичення життєздатної біомаси та пробіотичної активності виробничих штамів лактобактерій. Усереднені результати наведені в табл. 3 на прикладі маркерного штаму композиції *L. Rhamnosus LB3.*

***Таблиця* 3.** Ефективність живильних середовищ для вирощування лактобактерій

Показники інтенсивності накопичення біомаси	Середовище культивування		
	MPC	Глюкозо-піруватне	Соєве
Суха біомаса, г/л	5,772 ± 0,002	4,264 ± 0,002	4,668 ± 0,002
Оптична густина	0,743	0,484	0,69
Кількість КУО, КУО/мл	$2{,}455 \times 10^8$	6×10^6	$1{,}85 \times 10^8$
Кислотність, °Т	200	63	76

Примітка. Результати наведені для одного з робочих штамів *L. rhamnosus LB3*, оскільки проявлялась однакова тенденція у всіх досліджуваних культурах.

Так, згідно з результатами проведеного експерименту, продуктивність стандартного середовища для вирощування лактобактерій MRS є вищою за продуктивність альтернативних живильних середовищ. Разом із цим соєве живильне середовище, яке також характеризується достатньо високими показниками продуктивності, може бути перспективним у технології виробництва харчових продуктів функціонального призначення. Ці продукти поряд з пробіотичними культурами будуть містити легкозасвоюваний білок та інші біологічно активні компоненти сої. Саме тому використання соєвого живильного середовища для культивування молочнокислих бактерій у виробництві продуктів функціонального призначення дасть можливість збагатити ним кінцевий продукт та надати йому гарних смакових якостей, а отже, і добрих споживчих властивостей.

Висновки

Запропоновано склад альтернативного живильного середовища вирощування молочнокислих бактерій на основі соєвого молока, яке може бути ефективно використане в технології створення харчових домішок та продуктів функціонального харчування, що містять у своєму складі молочнокислі бактерії р. *Lactobacillus.*

Визначено оптимальний режим вирощування пробіотичних штамів лактобактерій на соєвому середовищі: температура культивування – 37 °С, доза посівного матеріалу від об'єму живильного середовища – 5 %, pH середовища – 7,0.

Подальші розробки з даної проблематики можуть будуть спрямовані на створення технологій біопрепаратів та продуктів функціонального харчування для дітей і людей похилого віку із різними порушеннями стану здоров'я.

1. *Тимченко Л.Д., Пенькова Н.И., Катутина Л.С.* Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капустная среда для культивирования лактобактерий // Вестник МГОУ. Сер. Естественные науки. – 2010. – № 2. – 152 с.
2. *Ростовые* и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой сред / М.Б. Цинберг, Д.Г. Дерябин, И.В. Денисова и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – 48, № 12. – С. 9–13.
3. *M. Polac-Berecka et al.,* "Optimization of Medium Composition for Enhansing Growth of Lactobacillus rhamnosus PEN Using Response Surfase Metodology", Polish J. Microbiol., vol. 59, no. 2, pp. 112–118. 2010.
4. *Сирая Т.Н., Грановский В.А.* Методы обработки экспериментальных данных при измерениях. – Л.: Энергоатомиздат, 1990. – 120 с.
5. *Горбатова К.К.* Биохимия молока и молочных продуктов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – С. 202–203.
6. *Шония Г.В.* Компонентный состав молока // Современные проблемы производства продуктов питания: Сб. докладов 7-й научно-практ. конф. с междунар. участием, 7–8 декабря, АлтГТУ им. И.И. Ползунова. – Барнаул: Изд-во АлтГТУ, 2004. – 215 с.
7. *Халіль Азіспур Х.* Оптимізація процесів культивування у виробництві пробіотичних препаратів на основі лактобаціл: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 02.00.20. – К., 2004. – 23 с.
8. *J. Bajpaj-Dikshit et al.,* "An optimal model for representing the kinetics of growth and product formation by *Lactobacillus* rhamnosus on multiple substrates", J. Biosci. Bioengin., vol. 96, no. 5, pp. 481–486, 2003.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
14 лютого 2013 року