

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР LACTOBACILLUS С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОСТРУКТУР

Сидорова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, Петрозаводский государственный университет - ПетрГУ, РФ, г. Петрозаводск

Васильева Алина Валерьевна

студент, Петрозаводский государственный университет - ПетрГУ, РФ, г. Петрозаводск

Березина Ольга Яковлевна

канд. физ.-мат. наук, доцент, Петрозаводский государственный университет - ПетрГУ, РФ, г. Петрозаводск

Маркова Надежда Павловна

старший преподаватель, Петрозаводский государственный университет - ПетрГУ, РФ, г. Петрозаводск

The method of obtaining enrichment culture of *Lactobacillus* using metal oxide nanostructures

Natalia Sidorova

candidate of Biological Sciences, assistant professor, Petrozavodsk State University - PetrSU, Russia, Petrozavodsk

Alina Vasilyeva

student, Petrozavodsk State University - PetrSU, Russia, Petrozavodsk

Olga Berezina

Candidate of Physical and Mathematical Sciences, assistant professor, Petrozavodsk State University - PetrSU, Russia, Petrozavodsk

Nadezhda Markova

Senior Lecturer, Petrozavodsk State University - PetrSU, Russia, Petrozavodsk

Аннотация. Цель работы – разработка методики получения накопительной

культуры *Lactobacillus acidophilus* с ускоренным синтезом вторичных метаболитов. Эффект достигается за счет иммобилизации на полимерном носителе, модифицированном за счет включения оксидов металлов.

Abstract. The purpose is to develop a method for obtaining a storage culture of *Lactobacillus acidophilus* with accelerated synthesis of secondary metabolites. The effect is achieved due to immobilization on a polymeric carrier, modified due to the inclusion of metal oxides.

Ключевые слова: пробиотики; биотехнология; иммобилизация; оксиды металлов; поливинилпирролидон.

Keywords: probiotics; biotechnology; immobilization; metal oxides; polyvinylpyrrolidone.

В биотехнологии пробиотических культур принцип закрепления, покрытия или иммобилизации клеток на органических или неорганических носителях используется для создания биологически активных препаратов, обладающих высокой степенью стабильности и эффективности [1, с. 128]. Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ перед свободными клетками и иммобилизованными ферментами в большей активности, стабильности и требуют гораздо меньше экономических затрат на получение [2, с. 34]. Предложен вариант иммобилизации за счет адсорбции микробных клеток на матрице наноструктурированного полимера за счет комплекса физических и химических реакций. Повысить эффективность технологии можно за счет модификации полимерного носителя включением в его структуру оксидов металлов. Для разработки метода получения накопительных культур *Lactobacillus acidophilus* и оптимизации процесса биосинтеза вторичных метаболитов лактобактериями использована чистая культура посевного материала штамма 317/402 Ер.п. в. «НАРИНЭ ААА», выделенная из фармакопейных пробиотических препаратов и иммобилизованная нанонитями поливинилпирролидона (PVP). В экспериментах использованы 2 варианта PVP: PVP1 и PVP2 (с добавлением ZnO). Для синтеза нитей PVP1 был приготовлен прозрачный раствор путем смешивания высокомолекулярного поливинилпирролидона ($M_r = 1,3 \cdot 10^6$ г/моль) с дистиллированной водой при комнатной температуре из расчета 0,13 г/мл. Для синтеза нитей PVP2 был приготовлен раствор путем смешивания раствора ацетата цинка двух водного ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) в дистиллированной воде и раствора высокомолекулярного PVP ($M_r = 1,3 \cdot 10^6$ г/моль) в этаноле.

Иммобилизация клеток *L. acidophilus* осуществлялась за счет образования ковалентных связей с активированным носителем на поперечной сшивке клеток за счет активных групп в клеточной стенке [3, с. 198]. Оксидные наноструктуры, как потенциальные носители для иммобилизации лактобактерий, вносили непосредственно в ростовую среду в количестве 0,0751 г (PVP1) и 0,0889 г (PVP2).

Метаболическую активность иммобилизованных штаммов *Lactobacillus acidophilus* оценивали по ферментативной активности и образованию DL-молочной кислоты с помощью титруемой кислотности (Т°) в соответствии с ГОСТ 3624. Титруемая кислотность показывает количество кубических сантиметров децинормального (0,1 N) раствора щёлочи, израсходованных на нейтрализацию 100 см³ молока с двойным объёмом дистиллированной воды в присутствии индикатора фенолфталеина. Момент окончания титрования это появление слабо-розового окрашивания, которое не исчезает в течение 1 минуты. Присутствие DL-молочной кислоты определяли качественной реакцией. Предварительно готовили 2 мл центрифугата, которые смешивали с 5 мл H₂SO₄ и 1 мл CuSO₄ · 5H₂O. Смесь нагревали на водяной бане при 100° С в течение 5 минут. После охлаждения добавляли 1 мл 0,2 % раствора тиюфена. В присутствии

молочной кислоты раствор окрашивался в малиново-красный цвет.

В процессе ферментации молочного сахара под действием лактазы иммобилизованных клеток *Lactobacillus acidophilus* оценивали динамику показателей pH и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) культуральной среды, которые являются технологическими параметрами и контролируют направление биохимических процессов в культуральной среде.

В течение 30 суток эксперимента численность живых стабилизированных PVP лактобактерий оставалась на очень высоком уровне. Количество связанных с матрицей PVP клеток бактерий существенно отличалось от свободных вариантов и превышало контрольные значения в эксперименте с использованием PVPI и PVPII с оксидом цинка. При этом, число жизнеспособных клеток *L. acidophilus* в условиях иммобилизации PVPI к концу эксперимента увеличилось от $3,4 \cdot 10^4$ КОЕ/мл до $7,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, а в условиях иммобилизации PVPII с ZnO - от $3,1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл до $4,1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Свободные от PVP клетки достигли максимума численности к 20 суткам эксперимента - $3,4 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, а через 10 суток их количество сократилась до $2,5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл (табл. 1).

Таблица 1.

Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) *L.acidophilus* в опыте и контроле

Период иммобилизации	PVPI	PVPII	Контроль
24 часа	$3,4 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^4$
10 суток	$4,3 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^6$
20 суток	$5,9 \cdot 10^8$	$4,7 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^5$
30 суток	$7,4 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^5$

Обработка лактобактерий поливинилпирролидоном существенно сказалась на метаболической активности молочнокислых бактерий, о чем свидетельствуют значения pH (3,10 и 3,80), которые установились в опытных культуральных средах к 30 суткам эксперимента. В контроле накопление молочной кислоты и, как следствие, уменьшение pH среды наблюдалось не так интенсивно, и к концу эксперимента составило всего 4,50 (табл. 2). Важно отметить, что низкие значения pH в опыте с PVPI и PVPII с ZnO не вызвали ингибирование роста бактерий и их численность продолжала последовательно увеличиваться. Окислительно-восстановительный потенциал культуральной среды в условиях опыта с PVPI увеличивался от +102 мВ до +360 мВ, а с PVPII - от +90 мВ до +342 мВ. В контроле, при культивировании лактобактерий без оксидных наноструктур увеличение ОВП наблюдалось только в течении 20 суток эксперимента (от +72 мВ до +203 мВ), а к 30 суткам - окислительно-восстановительный потенциал культуральной среды снизился до +169 мВ.

Таблица 2.

Динамика pH и ОВП культуральной среды в опыте и контроле

Период иммобилизации	PVPI	PVPII	Контроль
24 часа	<u>4,92*</u>	<u>5,20</u>	<u>6,10</u>
	102,7**	90,4	72,8
10 суток	<u>3,70</u>	<u>4,62</u>	<u>5,89</u>
	258,8	210,7	107,1
20 суток	<u>3,24</u>	<u>4,10</u>	<u>4,43</u>
	311,4	260,1	203,2
30 суток	<u>3,10</u>	<u>3,80</u>	<u>4,50</u>
	360,5	342,4	169,7

Примечание: * - показатели pH, ** - показатели ОВП

Динамика показателей титруемой кислотности (Т°) представлена в таблице 3.

При изучении метаболической активности иммобилизованных штаммов *Lactobacillus acidophilus* во всех вариантах эксперимента при постановке качественной реакции с H₂SO₄, CuSO₄ · 5H₂O и раствором тиофена, доказано присутствие DL-молочной кислоты. Более всего феномен изменения цвета раствора проявлялся в опыте с PVPII, а менее интенсивно – в контроле. Значительное увеличение титруемой кислотности зарегистрировано в опыте с использованием PVPI, за 30 суток эксперимента она увеличилась в 3,9 раз, в случае с PVPII - титруемая кислотность увеличилась в 3,1 раза, а в контроле – в 2, 6 раз.

Таблица 3.

Титруемая кислотность культуральной среды в опыте и контроле

Период иммобилизации	PVPI	PVPII	Контроль
24 часа	<u>80</u> DL МК +	<u>70</u> DL МК +	<u>50</u> DL МК +
10 суток	<u>110</u> DL МК +	<u>90</u> DL МК +	<u>100</u> DL МК +
20 суток	<u>140</u> DL МК +	<u>180</u> DL МК +	<u>130</u> DL МК +
30 суток	<u>310</u> DL МК +	<u>220</u> DL МК +	<u>130</u> DL МК +

По результатам проведенных исследований можно выдвинуть предложение по оптимизации технологии иммобилизации пробиотических культур. В серии экспериментов с использованием поливинилпирролидона и оксида цинка доказано, что иммобилизованные клетки *Lactobacillus acidophilus* штамма 317/402 Ер.п. в. «НАРИНЭ ААА» по сравнению со свободными обладают меньшей активностью, что обеспечивает быстрое накопление метаболитов, контролирующей интенсивность гомоферментативного брожения. В течение 30 суток эксперимента популяция иммобилизованных клеток сохраняла большее количество жизнеспособных особей, чем лактобактерии, растущие в жидких суспензионных культурах.

Список литературы:

1. Макаров К.А., Кибардин С.А. Иммобилизованные биопрепараты в медицине. М.: Медицина, 1980.
2. Корочинский А.В. Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // А.В. Корочинский, В.В. Верниковский, Э.Ф. Степанова // Успехи современного естествознания. 2010.
3. Образцова А.М., Сидорова Н.А. Метаболические и антагонистические свойства *Lactobacillus acidophilus* в присутствии полимеров заданной структуры // Полтораки А.Н., Балашов А.Т., Волкова Т.О. Современная медицина: от фундаментальной науки к клинической практике. – Киров: МЦНИП, 2014.

