

УДК 636.085:579:543.544-414

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАКРОПОРИСТЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОРМОВЫХ СИНБИОТИКОВ

¹Чижаева А.В., ¹Дудикова Г.Н., ¹Велямов М.Т., ²Потороко И.Ю., ¹Алимкулов Ж.С.,

¹Бутыркина Н.П., ¹Велямов Ш.М., ¹Курасова Л.А., ¹Жумалиева Т.М.

¹ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей
и пищевой промышленности», Алматы, e-mail: kazniippp@mail.ru;

²ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (НИУ),
Челябинск, e-mail: irina_potoroko@mail.ru

Хранение и применение пробиотических препаратов, в большинстве своем имеет ограничения из-за негативного влияния различных внешних факторов. Повысить жизнеспособность, стабильность пробиотических микроорганизмов и высокую биологическую доступность биотехнологического продукта можно посредством использования мягких методов иммобилизации, например адсорбции. Адсорбция, или закрепление клеток бактерий за счет физико-химических сил на носителе или сорбенте, позволяет сохранить длительное время их физиологическую и биохимическую активность, защитить от агрессивного внешнего влияния среды. Цель данной работы – усиление и стабилизация пробиотических свойств кормовых препаратов за счет адсорбции микроорганизмов на макропористых сорбентах. В данной статье рассмотрен способ адсорбции кормового пробиотика на различных макропористых сорбентах – аморфном кремнии в хелатной форме и модифицированном высокоуглеродистом шунгите. Объектом исследования служил консорциум молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* 22+ *Lb. pontis* 67+ *Lb. paracasei* 104, выделенных с поверхности зерна пшеницы различных регионов Казахстана и составляющих основу кормового пробиотического препарата. Исследование свойств молочнокислых бактерий пробиотического препарата осуществляли традиционными методами, принятыми в микробиологии и биотехнологии. Дана характеристика физиолого-биохимических свойств консорциума культур молочнокислых бактерий, составляющих основу кормового пробиотика. Определены концентрации сорбентов, повышающие титр клеток молочнокислых бактерий и их антагонистическую активность в жидком пробиотическом препарате. Показано, что иммобилизация пробиотического препарата на макропористых сорбентах высокоуглеродистом шунгите или аморфном кремнии позволяет усилить и стабилизировать пробиотические свойства жидкого синбиотика в течение 4–5 месяцев хранения при +6°C.

Ключевые слова: иммобилизация, адсорбция, сорбенты, шунгит, кремний, молочнокислые бактерии, пробиотические свойства, синбиотики

USE OF MACROPOROUS SORBENTS FOR STRENGTHENING AND STABILIZATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF FODDER SINBIOTICS

¹Chizhaeva A.V., ¹Dudikova G.N., ¹Velyamov M.T., ²Potoroko I.Yu., ¹Alimkulov Zh.S.,

¹Butyrkina N.P., ¹Velyamov Sh.M., ¹Kurasova L.A., ¹Zhumaliev T.M.

¹Kazakh Research Institute of the Processing and Food Industry LLP, Almaty, e-mail: kazniippp@mail.ru;

²FPIEI of the HE «Southern Ural state university (NRU)», Chelyabinsk, e-mail: irina_potoroko@mail.ru

Storage and use of probiotic preparations, in the majority has restrictions from negative impact of various external factors. To increase viability, stability of probiotic microorganisms and high biological availability of a biotechnological product it is possible by means use of the soft methods of an immobilization, for example, adsorption. Adsorption or fixing of bacteria cells at the expense of physical and chemical forces on the carrier or a sorbent, allows keeping the progressive time their physiological and biochemical activity, to protect from aggressive external influence of the environment. The purpose of this work – strengthening and stabilization of probiotic properties of fodder preparations due to adsorption of microorganisms on macroporous sorbents. In this article the way of fodder probiotic adsorption on various macroporous sorbents – amorphous silicon in the chelate form and the modified high-carbon shungit is considered. As the object of the research served the consortium of lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* 22 *Lb. pontis* 67 *Lb. paracasei* 104 allocated from the surface of wheat seed from various regions of Kazakhstan, and making the basis of fodder probiotic preparation. A research of lactic acid bacteria properties of probiotic preparation, carried out by the traditional methods accepted in a microbiology and biotechnology. Characteristic of physiological-biochemical properties of lactic acid bacteria consortium making the basis of the fodder probiotic is given. The concentration of sorbents raising a titre of lactic acid bacteria cells and their antagonistic activity in liquid probiotic preparation are defined. It is shown that the immobilization of probiotic preparation on macroporous sorbents the high-carbon shungit or amorphous silicon allows to strengthen and stabilize probiotic properties of liquid sinbiotic within 4-5 months of storage at 6°C.

Keywords: immobilization, adsorption, sorbents, shungit, silicon, lactic acid bacteria, probiotic properties, sinbiotic

В целях нормализации микрофлоры сельскохозяйственных животных рекомендуется применять синбиотики – препараты содержащие пробиотики или живые микро-

организмы и их метаболиты, а также пробиотики или вещества различной природы, стимулирующие рост и физиологическую активность микрофлоры животных [1, 2].

Для того, чтобы пробиотики оказывали необходимый профилактический или терапевтический эффект, количество живых клеток пробиотических микроорганизмов в одной дозе должно быть не менее 1×10^7 КОЕ/мл. Это связано с негативным влиянием внешних факторов на пробиотики при их хранении и применении, преодолением ими агрессивной среды желудка и т.д. Повысить жизнеспособность, стабильность пробиотических микроорганизмов и высокую биологическую доступность биотехнологического продукта можно посредством использования мягких методов иммобилизации, например, адсорбции. Микроорганизмы, прочно сцепленные с частичками сорбента (например активированного угля), беспрепятственно проникают в желудок. Энтеросорбент служит надежной защитой бактериям, притягивая к своей поверхности агрессивные вещества. Пробиотики, полученные методом иммобилизации, попадают в толстый кишечник, сохранив большую часть микроорганизмов. Наличие в составе препаратов энтеросорбента оказывает влияние не только на биодоступность, но и на лечебную активность препаратов: пробиотические бактерии крепятся к внутренней стенке кишечника; ускоряется рост и размножение полезных микроорганизмов; быстро снижается популяция бактерий, принадлежащих к условно-патогенной и патогенной микрофлоре. Жизнедеятельность микробов из полезного биоценоза сопровождается выделением в просвет ЖКТ метаболитов, создающих кислую среду pH. В таких условиях способна существовать только кишечная палочка, а численность стафилококков и клостридий постепенно снижается. Нормализация микробиоценоза приводит к восстановлению оптимального пищеварения и перистальтики [3–5].

По мнению А.В. Корочинского и других, для иммобилизации клеток микроорганизмов могут быть использованы вещества органической (хитин, древесина, целлюлоза) или неорганической (глины, песок, кремнеземы, угли) природы, искусственные неорганические носители (углеродные материалы, металлические сплавы, керамика) и синтетические полимеры (полиэтилен, нейлон, полиуретаны), а также природные биодegradуемые полимеры (пектин, альгинат, хитозан, каррагинан, фукоидан). Распространенные методы иммобилизации клеток можно разделить на три группы: связывание на твердом носителе, включение в пространственную структуру носителя и иммобилизация с использованием мембранной технологии [5].

Цель исследования: усиление и стабилизация пробиотических свойств кормовых препаратов за счет адсорбции микроорганизмов на макропористых сорбентах.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – консорциум культур молочнокислых бактерий *Lb. casei* 22+ *Lactobacillus pontis* 67+ *Lb. paracasei* 104, составляющий основу пробиотического препарата.

Для иммобилизации лактобацилл использовали макропористые сорбенты: модифицированный высокоуглеродистый шунгит и аморфный кремний в хелатной форме.

Поддержание и исследование культур микроорганизмов, консорциума на их основе и пробиотического препарата, осуществляли стандартными методами, принятыми в микробиологии и биотехнологии.

Иммобилизация клеток молочнокислых бактерий на шунгите и кремнии (жидкие пробиотики). В суточный, физиологически активный консорциум молочнокислых бактерий в питательной среде МРС с титром $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл добавляли сорбент (высокоуглеродистый шунгит или аморфный кремний) в количестве 0,05%; 0,1%; 0,5%. Иммобилизацию проводили в течение 24 ч при температуре 37°C, периодически встряхивая для перемешивания. Через час после внесения сорбентов пипеткой отделяли супернатант от сорбента и высевали методом Коха на плотную среду МРС для подтверждения уменьшения количества свободных клеток в культуральной жидкости. Далее жидкие препараты синбиотика, содержащие клетки лактобактерий и макропористых сорбентов, помещались на хранение в условиях бытового холодильника при температуре 4–6°C на 5 месяцев для оценки стабилизирующего эффекта сорбентов и определения их оптимального количества. Динамику роста иммобилизованных культур определяли, проводя последовательное разведение иммобилизаторов в жидкой среде МРС и/или с высевом разведений на плотную среду МРС.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Основу препарата составляет консорциум высокоактивных культур молочнокислых бактерий с коллекционными номерами – (В-449) *Lactobacillus pontis* 67, (В-7) *Lb. casei* 22, (В-446) *Lb. paracasei* 104. Эти культуры были выделены с поверхности зерна пшеницы из различных регионов Казахстана и исследованы в Казахском НИИ

перерабатывающей и пищевой промышленности, имеют генетические паспорта с идентифицированной последовательностью фрагмента гена *16S rRNA*.

У всех культур, составляющих консорциум, была исследована антагонистическая активность по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам: *B. subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli*-1257, *Staphylococcus sp.*209-P, *Salmonella typhimurum*. Оценка антагонистической активности методом отсроченного антагонизма показала, что у штаммов *Lactobacillus pontis* 67, *Lb. casei* 22 и *Lb. paracasei* 104 антагонистическая активность по отношению ко всем тест-культурам была высокой (табл. 1).

Консорциум культур молочнокислых бактерий *Lb. casei* 22+ *Lactobacillus pontis* 67+ *Lb. paracasei* 104 обладает высокой кислотообразующей, биохимической и антагонистической активностью, т.е. способностью подавлять рост условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания ЖКТ сельскохозяйственных животных, а также споровых бактерий, загрязняющих корма. Не менее важным свойством, которым должны обладать пробиотические культуры, является устойчивость к антибиотикам. Отобранные нами культуры МКБ устойчивы к действию канамицина, гентамицина, ванкомицина и фуразолидона. Физиолого-биохимическая характеристика консорциума на среде МРС: титруемая кислотность – $14,6 \pm 0,8$ °Н, титр клеток – $2,5 \times 10^9$ КОЕ/мл, антагонистическая активность (диаметр зоны подавления роста *B. subtilis*) – $22 \pm 0,5$ мм. Штаммы культивируются в смешанной культуре в соотношении 1:1:1 в течение 48 ч. При совместном культивировании отобранных культур достигнут принцип комплексного пробиотика – культуры микроорганизмов биосовместимы, их соотношение в консорциуме стабильно в течение длительного культивирования, они дополняют и усили-

вают активность друг друга, повышается их антагонистическая активность.

Наиболее простым, технологичным и экономичным способом иммобилизации для кормовых пробиотиков, на наш взгляд, представляется способ адсорбции на энтеросорбентах или пребиотиках, что позволит усовершенствовать компонентный состав пробиотического препарата по типу «синбиотика», усилить и стабилизировать пробиотические свойства препарата. В связи с этим нами была исследована возможность введения в состав жидкой питательной среды различных макропористых сорбентов: аморфного кремния в хелатной форме, модифицированного высокоуглеродистого шунгита (в концентрациях 0,05; 0,1; 0,5%) и проведена оценка их стимулирующего и стабилизирующего эффекта.

Наличие и величина зарядов играют главенствующую роль во взаимодействии клетка – сорбент, а природа адсорбционных сил таких взаимодействий определяется в первую очередь химическим составом клеточных стенок бактерий и функциональными группами самих сорбентов [7].

Известно, что грамположительные бактерии, в том числе и лактобациллы, несут на своей поверхности отрицательный заряд. Исследованиями Н.В. Потехиной показано, что отрицательный заряд клеточной поверхности обуславливается анионными полимерами клеточных стенок. Это в первую очередь относится к пептидогликану (ПГ) – макрополимеру. Отрицательный заряд ПГ формируют карбоксильные группы γ -глутаминовой и мезо-диаминопимелиновой кислот, а также терминальные остатки D-Ala пептидных субъединиц. Значительный вклад в формирование структуры полиэлектролитного геля клеточной стенки вносят тейхоевые кислоты (ТК) и липотейхоевые кислоты (ЛТК), а также другие анионные соединения, такие как тейхуроновые кислоты и сахар-1-фосфатные полимеры [8].

Таблица 1

Оценка антагонистической активности молочнокислых бактерий

Штамм	Зоны угнетения роста индикаторных культур (мм)			
	<i>Escherichia coli</i> -1257	<i>Staphylococcus sp.</i> 209-P	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Lb. pontis</i> 67	21 ± 1,0	17 ± 0,5	21 ± 1,3	19 ± 0,5
<i>Lb. casei</i> 22	23 ± 1,1	16 ± 0,5	22 ± 1,0	19 ± 0,3
<i>Lb. paracasei</i> 104	20 ± 0,8	16 ± 0,4	21 ± 1,2	17 ± 0,5
Консорциум <i>Lactobacillus pontis</i> 67+ <i>Lb. casei</i> 22 + <i>Lb. paracasei</i> 104	23 ± 1,2	18 ± 0,2	22 ± 0,5	20 ± 0,4

Исследуемые нами сорбенты являются макропористыми, благодаря аморфной структуре и обладают высокой адсорбционной активностью. Аморфность углерода модифицированного шунгита подтверждается неупорядоченным смещением графитоподобных сеток относительно друг друга. Однако, несмотря на то, что в сопоставлении с графитовым монослоем поликонденсированная сетка шунгита дефектна, сильно деформирована, сам шунгит можно считать имеющим довольно высокоупорядоченную структуру. Такую структуру по характеру дифракционной картины можно отнести к турбостратной углеродной структуре, подобно кристаллитам сажи, которым также свойственна двумерная упорядоченность. Кроме этого, на поверхности обогащенного высокоуглеродистого шунгита обнаруживаются органические соединения, при окислении которых могут появляться карбоксильные группы. Таким образом, при иммобилизации молочнокислых бактерий на высокоуглеродистом шунгите углеродные группы сорбента гидрофобной частью вступают в контакт с поверхностью клеток, а карбоксильные группы шунгита участвуют в хемосорбционных процессах.

Аморфный кремний во многом похож на углерод. Реакционная способность аморфного кремния выше, чем кристаллического.

В ходе исследований нами показано, что кремний и шунгит не оказывают отрицательного влияния на физиологическую активность и жизнеспособность клеток молочнокислых бактерий, более того, введение в среду МРС хелатной формы аморфного кремния и высокоуглеродистого шунгита в концентрации 0,1–0,5% способствует повышению титра МКБ через 24 ч культивирования до 10^{11} КОЕ/мл (табл. 2), а также повышению антагонистической активности консорциума МКБ в отношении *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – 23–25 мм (диаметр зоны подавления роста тест-культуры для определения антибиотической активности) (табл. 3).

Для оценки стабилизирующего эффекта сорбентов, иммобилизаты, содержащие консорциум молочнокислых бактерий, кремний и шунгит были заложены на хранение при температуре 6 °С в течение 5 месяцев. Нами установлено, что наибольшими стабилизирующими свойствами высокоуглеродистый шунгит обладает в концентрации 0,1%, а аморфный кремний (хелатная форма) в концентрации 0,1–0,5%.

Таблица 2

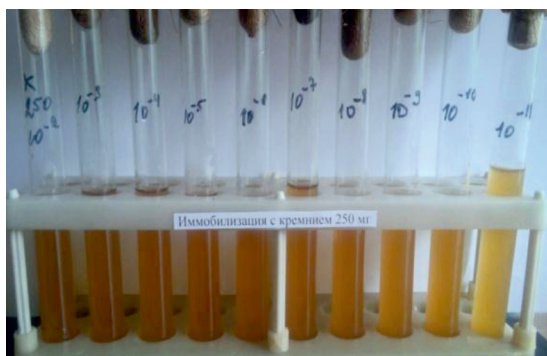
Титр клеток молочнокислых бактерий при росте на среде МРС с добавлением различных количеств сорбентов

Образцы	Сроки хранения, титр КОЕ/мл					
	Исх.	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.
0,05% шунгита	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}
0,1% шунгита	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}
0,5% шунгита	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}
0,05% кремния	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}
0,1% кремния	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}
0,5% кремния	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}	10^{11}
Контроль (без сорбента)	10^9	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5

Таблица 3

Антагонистическая активность молочнокислых бактерий при росте на среде МРС с добавлением различных количеств сорбентов

Образцы	Антагонистическая активность, диаметр зоны подавления роста <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, мм		
	Исх.	4 мес.	5 мес.
0,05% шунгита	23 ± 0,6	22 ± 0,7	22 ± 0,7
0,1% шунгита	25 ± 0,5	25 ± 0,4	27 ± 0,6
0,5% шунгита	24 ± 0,4	25 ± 0,6	25 ± 0,6
0,05% кремния	23 ± 0,4	22 ± 0,4	22 ± 0,6
0,1% кремния	25 ± 0,3	26 ± 0,4	26 ± 0,7
0,5% кремния	25 ± 0,5	25 ± 0,3	26 ± 0,3
Контроль (без сорбента)	22 ± 0,5	19 ± 0,3	17 ± 0,3



А



Б

*Влияние внесения 0,5% хелатной формы аморфного кремния в среду МРС на физиологическую активность консорциума МКБ, после 5 месяцев хранения: А – титр МКБ, 10^{11} КОЕ/мл; Б – антагонистическая активность МКБ в отношении тест-культуры для определения антибиотической активности *Bacillus subtilis* ATCC 6633*

Ингибирующими факторами, влияющими на рост микроорганизмов, являются уменьшение в культуральной жидкости питательных веществ и накопление продуктов обмена веществ или метаболитов. Введение же нами в жидкую питательную среду стабилизирующих сорбентов шунгита или кремния, концентрирующих культуры и связывающих метаболиты, способствовало увеличению времени экспоненциальной и линейной фаз роста МКБ и, как следствие, увеличению скорости роста и конечного выхода биомассы, а также повышению антагонистической и пробиотической активности МКБ.

Сорбенты аморфный кремний в хелатной форме и высокоуглеродистый шунгит способствуют стабилизации в течение 5 месяцев в жидкой среде МРС титра клеток консорциума лактобацилл на уровне 10^{11} КОЕ/мл и повышению их антагонистической активности до 26–27 мм (за счет накопления продуктов метаболизма) (рисунок).

Для получения жидкого пробиотического препарата консорциум молочнокислых бактерий заседали в количестве 5% в следующую питательную среду: смесь пшеничной и соевой муки + вода (гидромодуль 1:1,5) + 0,1% сорбент (модифицированный высокоуглеродистый шунгит или аморфный кремний в хелатной форме); культивирование проводили при температуре $35 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч. Данный технологический режим обеспечивал достижение необходимого уровня титруемой кислотности (14–16 град), рН (3,6–3,8), максимального количества жизнеспособных клеток МКБ (10^{11} КОЕ/мл) и высокого антагонизма (26 мм).

Полученный синбиотик, содержащий молочнокислые бактерии, далее был ис-

пользован для введения в состав кормовых добавок из отходов пивоваренной, спиртовой и крахмалопаточной промышленности.

Выводы

В ходе исследований нами подобраны стабилизирующие сорбенты – высокоуглеродистый шунгит и аморфный кремний (хелатная форма), которые при добавлении в жидкую форму пробиотического препарата в количестве 0,1% усиливают и поддерживают на высоком уровне пробиотические свойства кормового синбиотика на протяжении 5 месяцев.

Список литературы

1. Самуйленко А.Я., Титова Е.И., Неминущая Л.А., Воробьева Г.И., Провоторова О.В., Литвинова Е.О. Кормовые добавки на основе синбиотических комплексов – перспективы разработки и применения // Ветеринария и кормление. 2012. № 2. С. 22–24.
2. Волкова И. Пробиотики как альтернатива кормовым антибиотикам // Птицеводство. 2014. № 2. С. 9–15.
3. Шашкин А., Исаева Е. Влияние пробиотика на продуктивность и сохранность телят и поросят // Комбикорма. 2014. № 3. С. 89–90.
4. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты // Биотехнология. 2008. № 2. С. 30–45.
5. Корочинский А.В., Верниковский В.В., Степанова Э.Ф. Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // Успехи современного естествознания. 2010. № 5. С. 34–38.
6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Книга по Требованию, 2012. 352 с.
7. Ларионов И.В., Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Потокин И.Л., Сушко Т.П., Хрущева Т.А., Болдырев А.Г., Бондаренко В.М. Адсорбция пробиотических бактерий на целлюлозных носителях // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т. 11. Вып. 6. С. 792–798 [Электронный ресурс]. URL: http://www.chem.vsu.ru/sorbcr/images/pdf/2011/6/2011_06_08.pdf (дата обращения: 03.02.2019).
8. Потехина Н.В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 225–278.