

DAUGKARTINĖS LIOFILIZACIJOS ĮTAKA PROBIOTINĖMS LAKTOBACILŲ SAVYBĖMS

Antanas Sederevičius, Vaidas Oberauskas, Jonė Kantautaitė, Rasa Sutkevičienė
Lietuvos veterinarijos akademija, Virškinimo fiziologijos ir patologijos mokslinis centras, Tilžės g. 18, LT-3022
Kaunas, tel.: (8-37) 363143, faksas: (8-37) 362417, el. paštas: mentos@lva.lt

Santrauka. Žemės ūkio gyvulių fiziologinėms funkcijoms pagerinti dažnai naudojami pašarų priedai – probiotikai, kurių aktyvųjų pagrindą sudaro mikroorganizmai. Dažnai naudojami liofilizuoti probiotikai, kuriuose mikroorganizmų padermės yra anabiozės būsenoje.

Straipsnyje aptariamas daugkartinės liofilizacijos poveikis *Lactobacillus plantarum* U-14 ir *Lactobacillus fermentum* U-5 savybėms. Tirtos šios pienarūgščių mikroorganizmų savybės: antagonistinis aktyvumas *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* ir *Pseudomonas aeruginosa* atžvilgiu, rūgščių sudarymo aktyvumas (šešių dienų laikotarpiu), lizociminis aktyvumas, atsparumas antibiotikams (eritromicinui, linkomicinui, gentamicinui, neomicinui, kanamicinui, vankomicinui, kolistinui, oksitetraciklinui, imipenemui, ampicilinui, nitrofurams), atsparumas NaCl (2 %, 4 % ir 6 %), tulžiai (20 %, 30 % ir 40 %), šarminei terpei (pH 8,3), fenoliui (0,4 %), ilgam (30 min., 60 min. ir 90 min.) 60 °C temperatūros poveikiui.

Po *L. plantarum* liofilizacijos nustatyta, kad padidėjo šių laktobacilų atsparumas fenoliui, šarminei terpei, 6 % NaCl, sustiprėjo antagonistinis jų aktyvumas *S. enteritidis* ($p < 0,05$) ir susilpnėjo *E. faecalis* ($p < 0,001$) atžvilgiu. Antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas kitų mikroorganizmų atžvilgiu beveik nepakito ($p > 0,05$). Taip pat nepakito ir šių mikroorganizmų rūgščių gamybos intensyvumas, atsparumas antibiotikams, 20 %, 30 % ir 40 % koncentracijos tulžiai, šios laktobacilos liko neatsparios ilgam temperatūros poveikiui.

Po liofilizacijos išliko lizociminis *L. fermentum* aktyvumas, nepakito šių mikroorganizmų atsparumas 20 %, 30 % ir 40 % koncentracijos tulžiai, 2 % ir 4 % NaCl, tirtiems antibiotikams, jie liko neatsparūs 0,4 % fenoliui, šarminei terpei, ilgam temperatūros poveikiui. Be to, po liofilizacijos susilpnėjo antagonistinis *L. fermentum* aktyvumas visų mūsų tirtų sąlygiškai patogeninių kultūrų atžvilgiu, bet statistinio patikimumo nenustatyta ($p > 0,05$). Rūgščių gamybos intensyvumas pirmosiomis paromis po kiekvienos kitos liofilizacijos nekito, bet 5–6 parą po liofilizacijos rūgščių gamyba sulėtėjo 29,7 % ($p < 0,05$).

Mūsų tyrimų duomenimis, tirtų laktobacilų savybių pokyčiai, sukelti liofilizacijos, atsirado jau po pirmosios liofilizacijos, o tarp kitų liofilizacijų patikimų žymesnių pokyčių nenustatyta. Padermėms būdingas tirtas savybes liofilizacija nelabai pakeitė, todėl probiotikai, kurių sudėtyje yra mūsų tirtų laktobacilų, virškinimo trakto fiziologinėms funkcijoms normalizuoti gali būti naudojami ne tik skysti, bet ir liofilizuoti.

Raktažodžiai: *L. fermentum*, *L. plantarum*, liofilizacija, antagonistinis aktyvumas, lizociminis aktyvumas, antibiotikai, NaCl, tulžis, šarminė terpė, fenolis.

THE EFFECT OF MULTIFOLD LYOPHILIZATION ON THE PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTOBACILLUS

Summary. In order to improve physiological properties of domestic animals forage supplements – probiotic preparations, containing microorganisms, which obtain probiotic activity, are often applied. The most common application of probiotic preparations is in lyophilized form, where strains exist in the state of anabiosis.

The effect of multifold lyophilization on the properties of *Lactobacillus plantarum* U-14 and *Lactobacillus fermentum* U-5 was investigated. The following properties were studied: antagonistic activity (against *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*), the activity of acid production (for the 6 day period), lysozymic activity, resistance to antibiotics (erythromycin, linkomycin, gentamycin, neomycin, kanamycin, vancomycin, colistin, oxytetracycline, imipenem, ampicillin, nitrofurantoin), resistance to NaCl (2, 4 and 6%), bile (20, 30 and 40%), alkaline medium (pH 8.3), phenol (0.4%), long lasting temperature effect (60°C 30, 60 and 90 min.).

It can be concluded that lyophilization of *L. plantarum* caused higher resistance to phenol, alkaline medium, NaCl 6% concentration, increased antagonistic activity against *S. enteritidis* ($p < 0.05$), and decreased against – *E. faecalis* ($p < 0.001$). Antagonistic activity of *L. plantarum* against other microorganisms remained unchanged ($p > 0.05$). Lyophilization of *L. plantarum* has no effect on the intensity of acid production, resistance to 20, 30 and 40% bile, to studied antibiotics but it is not resistant to long lasting temperature effect.

After lyophilization *L. fermentum* sustain lysozymic activity, resistance to 20, 30 and 40% bile, 2 and 4% NaCl, all antibiotics, it has no resistance to 0.4% phenol, alkaline medium and long lasting temperature effect. Lyophilization also cause weaker antagonistic properties to all studied cultures, but we failed to determine any statistical reliability ($p > 0.05$). During first days after lyophilization the intensity of acid production fluctuated at the same ranges, but on the 5th–6th days acid production decreased in 29.7% ($p < 0.05$).

The changes of properties in studied lactobacillus strains occurred after the first lyophilization, between the following lyophilizations considerable changes were not determined. These changes in properties were not very significant, so it can be concluded that lactobacilli strains are applicable for normalization of the physiological functions in digestive system not only in liquid but in lyophilised form as well.

Keywords: *L. fermentum*, *L. plantarum*, lyophilization, antagonistic activity, lysozymic activity, antibiotics, NaCl, bile, alkaline medium, phenol.

Ivadas. Pašarų priedai – probiotikai yra veiksminga priemonė, tinkama žemės ūkio gyvulių fiziologinėms funkcijoms gerinti ir gyvulių disbakteriozės bei kitų nepalankių veiksnių poveikio profilaktikai. Probiotikai pagerina maisto medžiagų virškinamumą (El-Sawah et al., 1995; Hegazi et al., 1987), mažina pašarų sąnaudas, didina priesvorį (Šimkus, 2001) ir gerina mėsos kokybę. Nustatyta, kad jie 9–10 % padidina pašarų ėdamumą, 12–16 % – ląstelienos virškinamumą, 10–26 % – masės prieaugį (Тараканов, Николочева, 2000). Probiotiniai mikroorganizmai gerai prisitaiko ir dauginasi virškinimo trakte ir palaiko žarnyno mikrobu balansą. Išskirdami pieno ir kitas organines rūgštis, stiprias antibiotines medžiagas – bakteriocinus, vandenilio peroksida, jie slopina sąlygiškai patogeninių mikroorganizmų augimą (Apella et al., 1992; Bengmark, 1995; Gupta et al., 1998; Holo et al., 1998; Jack et al., 1990; Mital, Garg, 1995; Reid, 1999).

Antibiotikai ir kiti nepalankių sąlygų veiksniai gali sutrikdyti žarnyne normalią mikrobiologinę pusiausvyrą. Sutrikdytą pusiausvyrą galima atstatyti probiotikais. Probiotikai – tai gyvi virškinimo trakto mikroorganizmai – laktobacilos, bifidobakterijos, enterokokai ir kt. Probiotikai yra ekologiškai švarūs, ir gyvuliams juos galima suduoti nuo pirmosios gyvenimo dienos (Klein et al., 1998). Kad mikroorganizmai ilgai liktų gyvi, bakterijų masė liofilizuojama arba išdžiovinama purkštuvinėse džiovynose. Iki 1–5 % išdžiovinami mikroorganizmai lieka anabiozės būsenoje (Никитин, Звягин, 1971). Retai kada naudojami skysti probiotikai, nes jie galioja labai trumpai.

Liofilizacija yra pripažintas metodas probiotikų pramonėje (*National Nutritional Foods Association*, 1993). Juo mikroorganizmai džiovinami vakuume. Yra du šios procedūros etapai: sublimacija ir desorbcija. Sublimacija atliekama minusinėje temperatūroje ir jos metu iš preparato pašalinamas laisvas vanduo, o desorbcija atliekama plusinėje temperatūroje ir jos metu iš preparato pašalinamas sujungtas vanduo. Liofilizuotų mikroorganizmų ląstelių struktūrose lieka 1–5 % sujungto vandens, reikiamo mažiausiems gyvybiniam procesams palaikyti (Егорова, 1989). Liofilizuojamos bakterijos patiria stresą (užšaldymą, džiovinimą, rehidrataciją ir kt.), proceso metu gali būti pažeista jų ląstelės RNR, pailgėti log-fazė, pakisti struktūra (Егорова, 1989), o kartu pasikeisti ir kai kurios padermės būdingos fiziologinės ir biocheminės savybės (Банникова, 1975).

Ilgas įvairių fizikocheminių veiksnių (ultravioletinių, rentgeno spindulių, antibiotikų ir kt.) poveikis gali sukelti mikroorganizmų mutacijas. Mutavusių mikroorganizmų savybės gali skirtis nuo mutacijų nepatyrusių tos pačios padermės mikroorganizmų: gali pasireikšti naujų požymių, sustiprėti arba visai išnykti buvę būdingi

požymiai. Iš literatūros šaltinių nepavyko sužinoti, kokį poveikį mikroorganizmams turi daugkartinė liofilizacija.

Darbo tikslas – ištirti daugkartinės liofilizacijos įtaką *L. plantarum* U-14 ir *L. fermentum* U-5 savybėms: antagonistiniam poveikiui sąlygiškai patogeniniams mikroorganizmams, rūgščių sudarymo aktyvumui, lizociminiam aktyvumui, atsparumui antibiotikams, NaCl, tulžiai, šarminei terpei, fenoliui, ilgam temperatūros poveikiui.

Tyrimo metodai ir sąlygos. Tyrimai atlikti Lietuvos veterinarijos akademijos Virškinimo fiziologijos ir patologijos mokslinio centro Mikrobiologijos laboratorijoje. Tirta daugkartinės (penkis kartus kartotos) liofilizacijos įtaka dviejų laktobacilų padermių – *L. fermentum* U-5 (išskirtos iš sveiko veršelio fekalijų) ir *L. plantarum* U-14 (išskirtos iš sveikos karvės makšties) savybėms. Liofilizacijai naudotas liofilizatorius GT2 (*Leybold-Heraeus*, Vokietija). Laktobacilos stacionarios augimo fazės metu užpildytos apsaugine terpe, kurios pagrindą sudaro neriebus pienas ir gliukozė (Lachema, Čekija), ir po 5 ml išpilstytos į sterilius stiklinius flakonus. Gauta suspensija užšaldyta iki -40 °C, o liofilizacijos pabaigoje atšildyta iki 30 °C temperatūros. Likutinė liofilizuoto produkto drėgmė 2–3 %. Po kiekvienos liofilizacijos kultūra iš naujo atgaivinta. Iš viso kultūra liofilizuota 5 kartus. Po kiekvienos liofilizacijos laktobacilos tirtos jau kultivuojant optimaliose augimo temperatūrose (*L. plantarum* – 30 °C, o *L. fermentum* – 37 °C) (Sederevičius et al., 2001). Po kiekvienos liofilizacijos atliktų tyrimų rezultatai lyginti tarpusavyje ir su neliofilizuotų periodiškai persejamų kultūrų (kontrolė) savybėmis. Tirtos šios mikroorganizmų padermių savybės:

- ♦ antagonistinis aktyvumas *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* ir *Pseudomonas aeruginosa* atžvilgiu, nustatant neaugimo zonų ilgį standžiojoje terpėje (Медицинская микробиология, 1999);

- ♦ rūgščių sudarymo aktyvumas šešių dienų laikotarpiu, nustatant pH, bendrą rūgštingumą (°T) (Квасников, Нестеренко, 1975);

- ♦ lizociminis aktyvumas;

- ♦ atsparumas antibiotikams (eritromicinui, linkomicinui, gentamicinui, neomicinui, kanamicinui, vankomicinui, kolistinui, oksitetraciklinui, imipenemui, ampicilinui, nitrofurams) Kirby-Bauerio metodu (Медицинская микробиология, 1999);

- ♦ atsparumas NaCl (2 %, 4 % ir 6 %), tulžiai (20 %, 30 % ir 40 %), šarminei terpei (pH 8,3), fenoliui (0,4 %), ilgam (30 min., 60 min. ir 90 min.) 60 °C temperatūros poveikiui (Банникова и др., 1987).

Atsparumui antibiotikams ir antagonistiniam aktyvumui nustatyti naudotos laktobacilų ir sąlygiškai patogeninių bakterijų 0,5 *McFarland* tankumo kultūros (“*CrystalSpec*”, JAV).

Tirtos savybės vertintos pagal 3 analogiškų mėginių tyrimo rezultatus. Tyrimo rezultatai apdoroti statistinės analizės metodu (Juozaitienė, Kerzienė, 2001) *Win Excel* programa.

Tyrimų rezultatai. Atlikus daugkartinę *L. plantarum* liofilizaciją, nustatyta, kad jau po pirmosios liofilizacijos šios laktobacilos tapo atsparesnės 6 % NaCl, 0,4 % fenoliui, šarminei terpei (pH 8,3), nepakito jų atsparumas 20 %, 30 % ir 40 % koncentracijos tulžiai. Kultūra liko neatspari ilgam 60 °C temperatūros poveikiui (1 lentelė) ir nepakito mikroorganizmų rūgščių gamybos intensyvumas (3, 5 pav.), lizociminis aktyvumas. Jau po pirmosios liofilizacijos padidėjo antagonistinis jų aktyvumas *S. enteritidis* (p<0,05) ir susilpnėjo *E. faecalis* (p<0,001) atžvilgiu.

1 lentelė. Daugkartinės liofilizacijos įtaka *L. plantarum* savybėms

<i>Lactobacillus plantarum</i> savybės	Liofilizacijos įtaka					
	kontrolė	I	II	III	IV	V
Atsparumas:						
tulžiai						
20 %	+	+	+	+	+	+
30%	+	+	+	+	+	+
40 %	+	+	+	+	+	+
NaCl						
2 %	+	+	+	+	+	+
4 %	+	+	+	+	+	+
6 %	-	+	+	+	+	+
0,4 % fenoliui						
24 h	-	-	-	-	-	-
48 h	-	+	+	+	+	+
šarminei terpei (pH 8,3)	-	+	+	+	+	+
60 °C temperatūros poveikiui						
30 min.	-	-	-	-	-	-
60 min.	-	-	-	-	-	-
90 min.	-	-	-	-	-	-
Lizociminis aktyvumas	-	-	-	-	-	-

Pastaba: + – reakcija teigiama, - – reakcija neigiama.

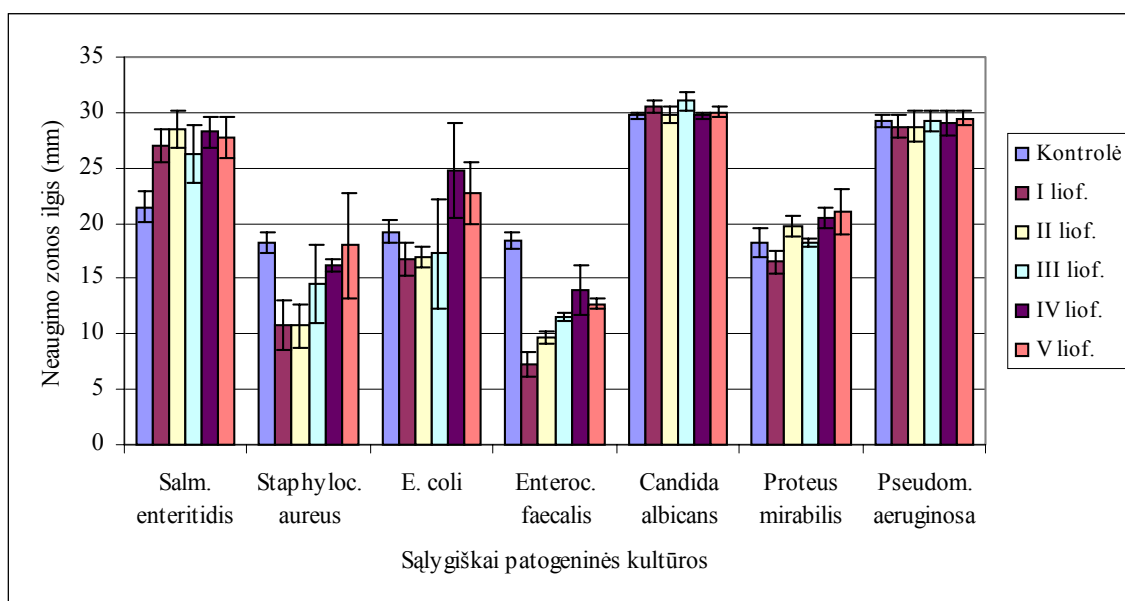
2 lentelė. Daugkartinės liofilizacijos įtaka *L. plantarum* atsparumui antibiotikams

Antibiotikai	Liofilizacijos įtaka					
	kontrolė	I	II	III	IV	V
<i>Erythromycin</i> , 15 µg*	A	A	A	A	A	A
<i>Lincomycin</i> , 2 µg*	A	A	A	A	A	A
<i>Gentamycin</i> , 10 µg*	A	A	A	A	A	A
<i>Neomycin</i> , 30 µg*	A	A	A	A	A	A
<i>Kanamycin</i> , 30 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Vancomycin</i> , 30 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Colistin</i> , 10 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Nitrofurantoin</i> , 300 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Oxytetracycline</i> , 30 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Imipenem</i> , 10 µg**	NJ	NJ	NJ	NJ	NJ	NJ
<i>Ampicillin</i> , 10 µg**	A	A	A	A	A	A

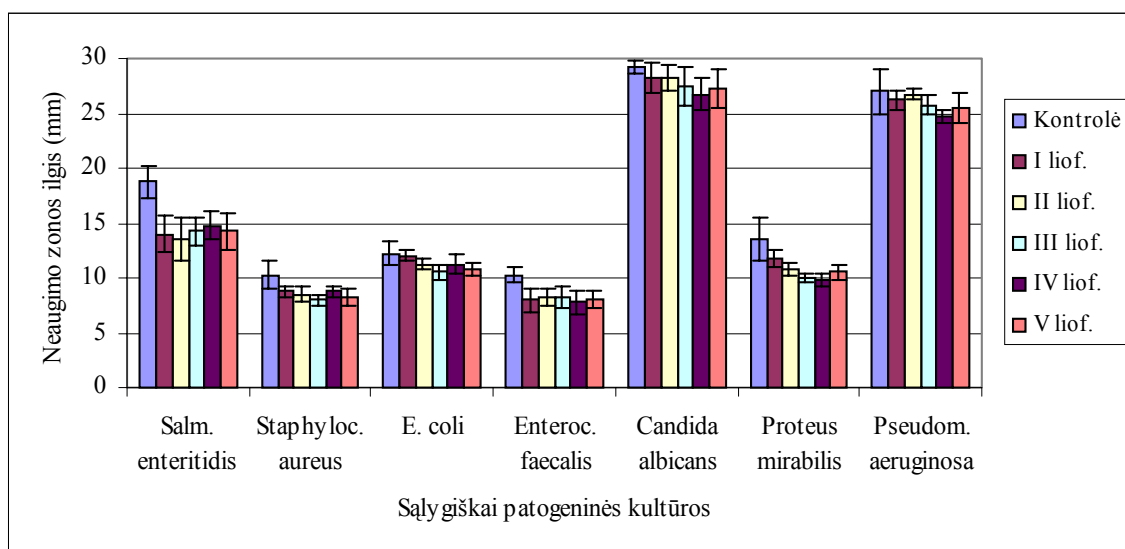
Pastaba: * – “*Liofilchem*” (Italija), ** – “*Bioanalyse*” (Turkija), A – atsparus, NJ – nelabai jautrus.

Po pirmųjų dviejų liofilizacijų sumažėjo antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas *S. aureus* (I, II – p<0,05) atžvilgiu, o po kitų liofilizacijų jis atsinaujino (1 pav.). Per pirmąsias tris liofilizacijas šiek tiek sumažėjo antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas *E. coli* (p>0,05) atžvilgiu, o po ketvirtosios ir penktosios liofilizacijos šis aktyvumas padidėjo, palyginti su kontrolinių laktobacilų aktyvumu, bet statistinio patikimumo nenustatyta. Antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* ir *Pseudomonas aeruginosa* atžvilgiu beveik nepakito. Liofilizacija neturėjo įtakos *L. plantarum* atsparumui antibiotikams (2 lentelė).

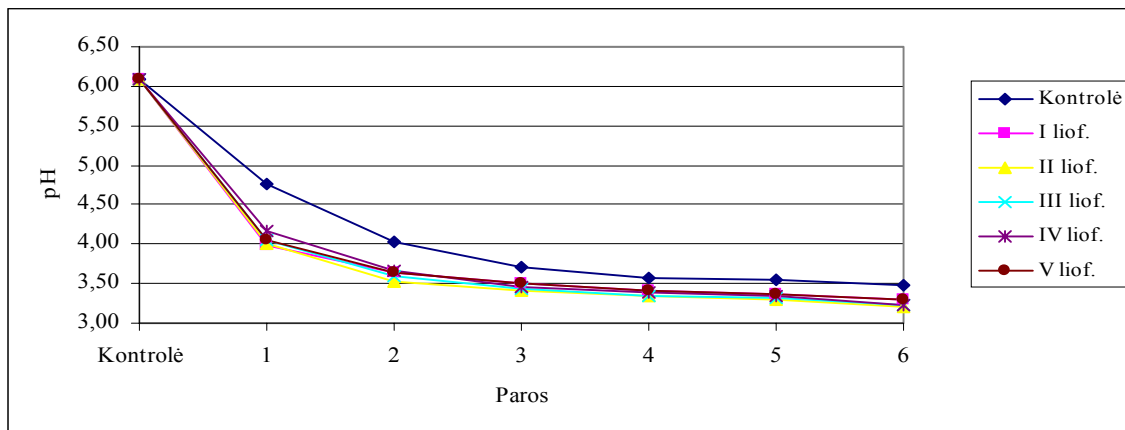
Atliekant daugkartinę *L. fermentum* liofilizaciją, nustatyta, kad nepakito lizociminis šių laktobacilų aktyvumas, jos liko atsparios 20 %, 30 % ir 40 % koncentracijos tulžiai ir 2 %, 4 % NaCl, neatsparios 0,4 % fenoliui, šarminei terpei (pH 8,3) ir ilgam 60 °C temperatūros poveikiui (3 lentelė). Po liofilizacijų nustatyta, kad sumažėjo antagonistinis *L. fermentum* aktyvumas visų tirtų sąlygiškai patogeninių kultūrų atžvilgiu, bet statistinio patikimumo nenustatyta (p>0,05) (2 pav.). *L. fermentum* rūgščių gamybos intensyvumas pirmosiomis paromis po liofilizacijos nepakito, bet po 5–6 parų liofilizuotų mikroorganizmų rūgščių gamyba sulėtėjo 29,7 % (p<0,05) (4, 6 pav.).



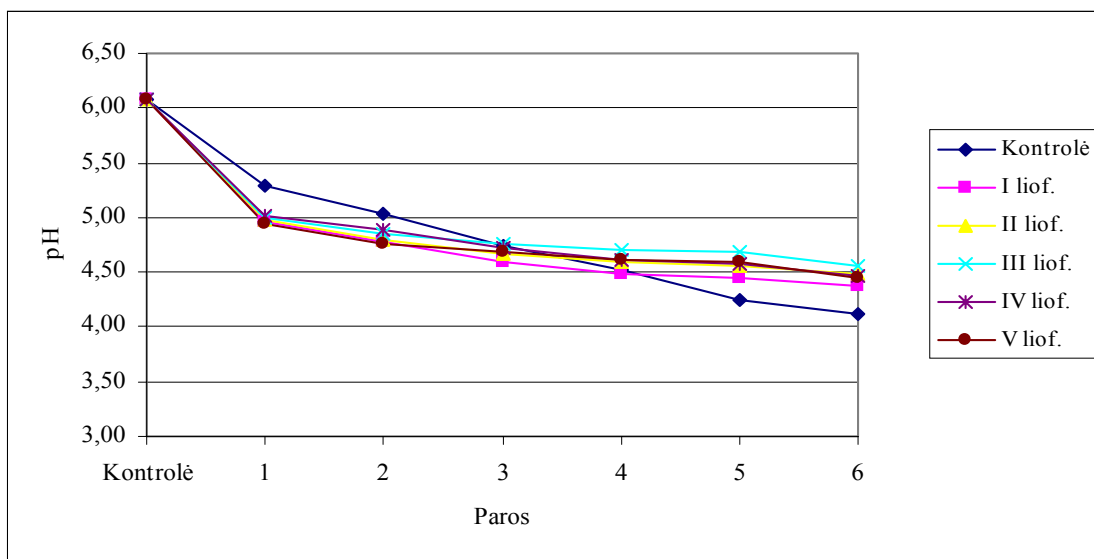
1 paveikslas. *L. plantarum* antagonistinės savybės



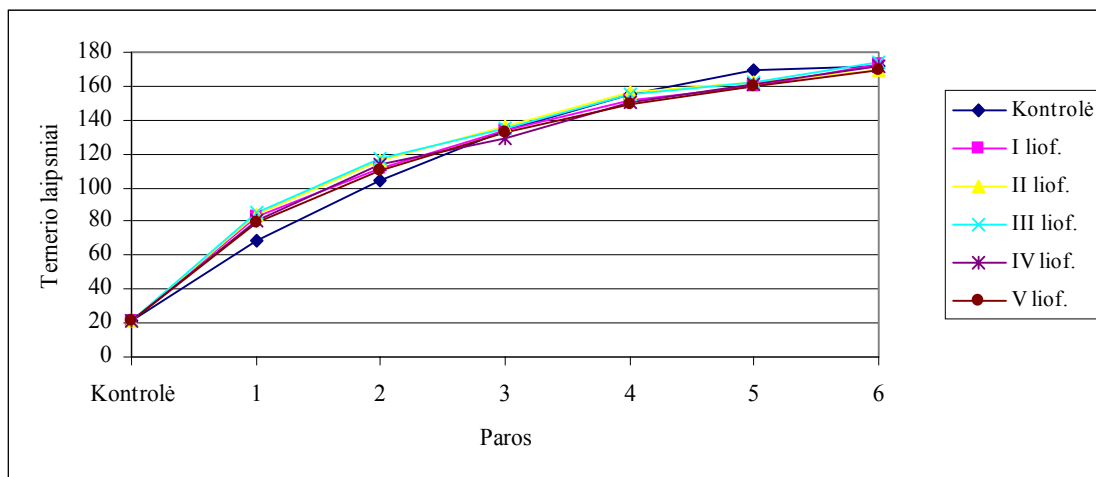
2 paveikslas. *L. fermentum* antagonistinės savybės



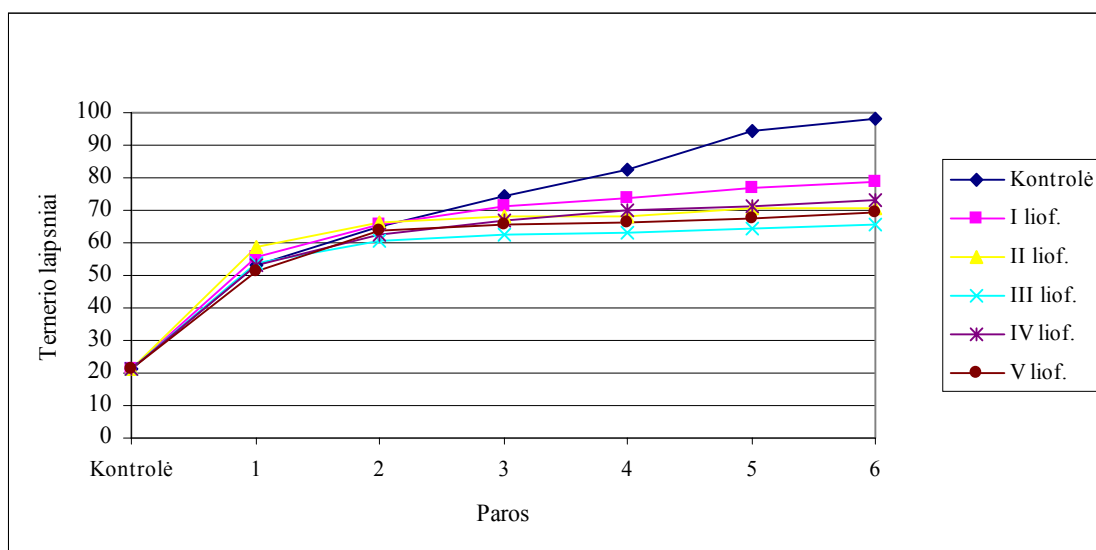
3 paveikslas. *L. plantarum* pH kitimas



4 paveikslas. *L. fermentum* pH kitimas



5 paveikslas. *L. plantarum* bendro rūgštingumo kitimas



6 paveikslas. *L. fermentum* bendro rūgštingumo kitimas

3 lentelė. Daugkartinės liofilizacijos įtaka *L. fermentum* savybėms

<i>Lactobacillus fermentum</i> savybės	Liofilizacijos įtaka					
	kontrolė	I	II	III	IV	V
Atsparumas:						
tulžiai						
20 %	+	+	+	+	+	+
30 %	+	+	+	+	+	+
40 %	+	+	+	+	+	+
NaCl						
2 %	+	+	+	+	+	+
4 %	+	+	+	+	+	+
6 %	-	-	-	-	-	-
0,4 % fenoliui						
24 h	-	-	-	-	-	-
48 h	-	-	-	-	-	-
šarminėi terpei (pH 8,3)	-	-	-	-	-	-
60 °C temperatūros poveikiui						
30 min.	-	-	-	-	-	-
60 min.	-	-	-	-	-	-
90 min.	-	-	-	-	-	-
Lizociminis aktyvumas	+	+	+	+	+	+

Pastaba: + – reakcija teigiama, – – reakcija neigiama.

4 lentelė. Daugkartinės liofilizacijos įtaka *L. fermentum* atsparumui antibiotikams

Antibiotikai	kontrolė	Liofilizacijos įtaka				
		I	II	III	IV	V
<i>Erythromycin</i> , 15 µg*	A	A	A	A	A	A
<i>Lincomycin</i> , 2 µg*	NJ	NJ	NJ	NJ	NJ	NJ
<i>Gentamycin</i> , 10 µg*	A	A	A	A	A	A
<i>Neomycin</i> , 30 µg*	A	A	A	A	A	A
<i>Kanamycin</i> , 30 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Vancomycin</i> , 30 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Colistin</i> , 10 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Nitrofurantoin</i> , 300 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Oxytetracycline</i> , 30 µg**	A	A	A	A	A	A
<i>Imipenem</i> , 10 µg**	NJ	NJ	NJ	NJ	NJ	NJ
<i>Ampicillin</i> , 10 µg**	A	A	A	A	A	A

Pastaba: * – “Liofilchem” (Italija), ** – “Bioanalyse” (Turkija), A – atsparus, NJ – nelabai jautrus.

Daugkartinė *L. fermentum*, kaip ir *L. plantarum*,

lioofilizacija neturėjo įtakos *Lactobacillus* atsparumui antibiotikams (4 lentelė).

Aptarimas ir išvados. Tyrimų rezultatai rodo, kad daugkartinė liofilizacija mažiau kenkė *L. plantarum* negu *L. fermentum* savybėms. Kai kurios *L. plantarum* savybės sustiprėjo jau po pirmosios liofilizacijos: palyginti su periodiškai persėjamosiomis kultūromis ir ankstesnių tyrimų (Sederevičius et al., 2001) duomenimis, padidėjo šių *Lactobacillus* atsparumas 6 % NaCl, 0,4 % fenoliui ir šarminėi terpei (pH 8,3). Iš 1 lentelės duomenų matyti, kad liofilizacijos neturėjo įtakos *L. plantarum* atsparumui 20 %, 30 % ir 40 % koncentracijos tulžiai ir ilgam temperatūros poveikiui. Kitaip negu *L. fermentum*, *L. plantarum* nepasizymėjo lizociminiu aktyvumu (tai nebūdinga *L. plantarum* savybė). Iš 2 lentelės matyti, kad daugkartinė liofilizacija neturėjo įtakos *L. fermentum* savybėms, būtent, atsparumui tirtų koncentracijų NaCl ir tulžiai, šarminėi terpei ir ilgam 60 °C temperatūros poveikiui.

Tiriant *L. plantarum* ir *L. fermentum* atsparumą antibiotikams (žr. 3 ir 4 lenteles), nustatyta, kad liofilizacija neturėjo įtakos tirtų padermių mikroorganizmų atsparumui tirtiems antibiotikams. *L. plantarum* liko vidutiniškai jautrios plataus veikimo spektro antibiotikui – imipenemui, o *L. fermentum* – imipenemui ir linkomicinui. Literatūros duomenimis, po liofilizacijos daugumos pienarūgščių bakterijų antibiotinis aktyvumas nepasikeičia (Банникова, 1975), o sumažėjęs antibiotinis aktyvumas atsinaujina 2–3 kartus persėjus kultūrą į maitinamąją terpę (Stoyanova, Arkadjeva, 2000).

Iš 1 paveikslų matyti, kad antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas *S. enteritidis* atžvilgiu padidėjo jau po pirmosios liofilizacijos ir toks pat liko ir po kitų liofilizacijų. Po pirmosios liofilizacijos sumažėjo antagonistinis šių *Lactobacillus* aktyvumas *S. aureus* ir *E. coli* atžvilgiu ir, kaip matyti iš 1 paveikslų, jis atsinaujina po ketvirtosios ir penktosios liofilizacijos, o *E. coli* atžvilgiu jis dar padidėjo, palyginti su periodiškai persėjamų kultūrų aktyvumu. Po pirmosios liofilizacijos gerokai sumažėjo antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas *E. faecalis* atžvilgiu, bet po kitų liofilizacijų jis padidėjo. Antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* ir *Pseudomonas aeruginosa* atžvilgiu beveik nepakitė.

Antagonistiniams *L. fermentum* aktyvumui liofilizacija labiau pakenkė negu *L. plantarum*. Iš 2 paveikslų matyti, kad po liofilizacijų sumažėjo antagonistinis aktyvumas visų tirtų sąlygiškai patogeninių bakterijų atžvilgiu. Liofilizacija turėjo įtakos ir *L. fermentum* rūgščių gamybos intensyvumui. Iš 4 ir 6 paveikslų matyti, kad liofilizuotų *L. fermentum* rūgščių gamyba pirmosiomis paromis nesikeitė, bet penktąją ir šeštąją parą ji sulėtėjo. *L. plantarum* rūgščių gamybos intensyvumas nepakitė (žr. 3, 5 pav.). Literatūros duomenimis, po liofilizacijos daugelio pienarūgščių bakterijų rūgščių gamybos intensyvumas nesikeičia, o kai kurių (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*) gali net padidėti (Банникова, 1975).

Liofilizacijos metu žema temperatūra stimuliuoja mikroorganizmus, todėl padidėja biocheminis jų

aktyvumas. Žūstant jautrioms bakterinėms ląstelėms, vyksta jų selekcija (Банникова, 1975).

Atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad daugeliui laktobacilų savybių daugkartinė liofilizacija neturi įtakos, o savybės, pvz., antagonistinis *L. plantarum* aktyvumas kai kurių sąlygiškai patogeninių bakterijų atžvilgiu, labiau sustiprėja po kitų liofilizacijų negu po pirmosios. Šie tyrimai rodo, kad tikslinga toliau tirti tolesnių liofilizacijų įtaką pageidautinoms laktobacilų savybėms.

Išvados. 1. Po daugkartinės liofilizacijos padidėjo *L. plantarum* atsparumas 6 % NaCl, 0,4 % fenoliui ir šarminei terpei (pH 8,3) bei antagonistinis aktyvumas *S. enteritidis* (p<0,05) ir sumažėjo *E. faecalis* (p<0,001) atžvilgiu.

2. Po daugkartinės liofilizacijos 5–6 augimo dieną 29,7 % sumažėjo (p<0,05) *L. fermentum* rūgščių gamybos intensyvumas bei antagonistinis aktyvumas visų tirtų sąlygiškai patogeninių kultūrų atžvilgiu, bet statistinio patikimumo nenustatyta.

3. Daugkartinė liofilizacija neturėjo įtakos tirtų padermių mikroorganizmų atsparumui antibiotikams, 20 %, 30 %, 40 % koncentracijos tulžiai ir ilgam 60 °C temperatūros poveikiui, *L. plantarum* – rūgščių gamybos intensyvumui, *L. fermentum* – atsparumui 2 % ir 4 % NaCl, 0,4 % fenoliui, šarminei terpei (pH 8,3) ir lizociminių aktyvumui.

4. Atliekant daugkartinę liofilizaciją, galima atrinkti liofilizacijai atsparias padermes, turinčias pageidautinas probiotines savybes, ir taip vykdyti jų selekciją.

Literatūra

- Apella M. C. et al. In vitro studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*. J. Appl. Bacteriol. 1992. Vol. 73. N. 6. P. 480–483.
- Bengmark S. Colonic food: pre- and probiotics. Am. J. Gastroenterol. 2000. Vol. 95. N. 1. P. 5–7.
- El-Sawah M. M. et al. Enzymatic properties of lipase and characteristics production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Antonie Van Leeuwenhoek. 1995. Vol. 67. N. 4. P. 357–362.
- Gupta K. et al. Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. J. Infect. Dis. 1998. Vol. 178. N. 2. P. 446–450.
- Hegazi F.Z., et al. Proteolytic activity of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. Nahrung. 1987. Vol. 31. N. 3. P. 225–232.
- Holo H. et al. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. Vol. 49. N. 5. P. 606–612.
- Jack M. et al. Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. Microbios. 1990. Vol. 62. P. 37–46.
- Juozaitienė V., Kerzienė S. Biometrija ir kompiuterinė duomenų analizė. Kaunas, 2001. 114 p.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 1998. Vol. 41. N. 2. P. 103–125.
- Mital B. K., Garg S. K. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. Crit. Rev. Microbiol. 1995. Vol. 21. N. 3. P. 175–214.
- National Nutritional Foods Association. Minutes of the Probiotics Interest Group Meeting. Las Vegas, NV, 1993. 20 p.
- Reid G. The scientific basis for probiotics strains of *Lactobacillus*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. Vol. 65. No. 9. P. 3763–3766.
- Sederevičius A., Kantautaitė J., Sutkevičienė R. ir kt. *L. plantarum* U-14, *L. fermentum* U-5 padermių ir jų mišinio pH, titruojamojo rūgštingumo ir gyvybingumo kitimas. Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija, 2001. T.14 (36). P.52–.
- Sederevičius A., Kantautaitė J., Sutkevičienė R. ir kt. Laktobacilų padermių savybių tyrimai. Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija, 2001. T.16 (38). P.65–67.
- Stoyanova L. G., Arkadjeva Z. A. Comparison of methods of storing lactic acid bacteria. Microbiology. 2000. Vol. 69. N. 1. P. 83–88.
- Šimkus A. Probiotikų naudojimas veršelių racionuose. Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija, 2001. T.16 (38). P.137–139.
- Tršić-Milanovic N., Kodžić A., Baras J., Dimitrijević-Branković S. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. J.Serb.Chem.Soc. 2001. Vol. 66 N. 7. P. 435–441.
- Банникова Л. А., Королева Н. С., Семенихина В. Ф. Микробиологические основы молочного производства. М.: Агропромиздат, 1987. 390 с.
- Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. М., 1975. 256 с.
- Егорова Н. С. Промышленная микробиология. М.: «Высшая школа», 1989. С. 117–169.
- Квасников Е. И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: «Наука», 1975. С. 235–242.
- Медицинская микробиология. Москва: ГЭОТАР Медицина, 1999. С. 113–164.
- Никитин Е. Е., Звягин И. В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. Москва: Колос, 1971. С. 183–197.
- Тараканов Б. В., Николичева Т. А. Новые биопрепараты для ветеринарии. Ветеринария. 2000. №.7. С. 45–50.

2002 11 20