

## СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2019 г. Ю. А. Николаев<sup>а</sup>, \*, Е. Ф. Шаненко<sup>б</sup>, Г. И. Эль-Регистан<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет пищевых производств, Москва, 125080 Россия

\*e-mail: NikolaevYA@mail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2019 г.

После доработки 31.03.2019 г.

Принята к публикации 25.05.2019 г.

В работе исследованы приемы стабилизации клеток молочнокислых организмов (МКО), позволившие в течение 12 мес. поддерживать титр живых клеток на уровне  $10^7$ – $10^8$  кл./мл, рекомендованном для титра МКО в продуктах питания. Выявлена высокая эффективность использования природных ассоциаций МКО, селективированных по признаку длительного сохранения клетками МКО жизнеспособности. Из селективированной в течение 6 мес. ассоциации, выделенной из рыночной простокваши, были получены в чистых культурах молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* и дрожжи *Candida parapsilosis*. Скорость гибели этих МКО в бинарной культуре (по 50% каждого ассоцианта) была в несколько раз ниже, чем в монокультурах. Применение дополнительных приемов стабилизации клеток бинарной культуры МКО (бескислородные условия и внесение стабилизирующих добавок антиоксидантов и биополимеров) повысило численность жизнеспособных клеток в культурах, хранящихся в течение 12 мес., в 5–6 раз. Предложенный алгоритм использования сочетающихся приемов пролонгирования жизнеспособности клеток в длительно (до 12 мес.) хранящихся культурах молочнокислых организмов предложен впервые и может быть рекомендован для стабилизации клеток МКО как в кисломолочных пищевых продуктах, так и в заквасочных культурах. В работе впервые показано, что дрожжевым компонентом стабильной ассоциации с молочнокислыми бактериями является *C. parapsilosis*.

**Ключевые слова:** молочнокислые микроорганизмы, бинарные культуры, *Lactobacillus plantarum*, *Candida parapsilosis*, пролонгирование жизнеспособности, стабилизация клеток

DOI: 10.1134/S0026365619050124

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются важной группой бактерий-симбионтов животных и растений. В природе они встречаются на поверхности растений, фруктов, овощей, зерна, в молоке, наружных и внутренних эпителиальных покровах человека, животных, птиц, рыб. МКБ обладают рядом биохимических особенностей, на основании которых они выделены в отдельную физиологическую группу важнейших для человека пробиотических бактерий, обладающих способностью к образованию молочной кислоты, продукции высокоактивных внеклеточных гидролаз, синтезу бактериоцинов, нейроактивных биогенных аминов, сбраживанию растительных и животных углеводов (Sonomoto, Yokota, 2011; Lantinen et al., 2012; Олескин и соавт., 2016).

Следует отметить, что МКБ часто образуют симбиозы с грибами (в т.ч. дрожжами), развиваясь в виде сложных ассоциаций, например, в чайном грибе (Юркевич, Кутышенко, 2002; Рого-

жин, Рогожин 2017), кефирном зерне (Lopitz-Otsoa et al., 2006), при сбраживании суслу для получения квасов, сквашивании растительных продуктов и в других случаях. По этой причине стал широко употребим термин “молочнокислые организмы” (МКО), объединяющий молочнокислые бактерии и грибы.

Обладая вышеперечисленными свойствами, МКО играют важную роль в пищевых биотехнологиях для получения кисломолочных и квашеных продуктов, напитков, широко применяются в сельском хозяйстве, медицине и других отраслях (Sonomoto, Yokota, 2011; Lantinen et al., 2012; Олескин и соавт., 2016).

Недостатком продуктов на основе МКО является высокая скорость отмирания их клеток (Thomas, Batt, 1968; Ng et al., 2011). Как правило, сроки хранения, при которых титр МКО сохраняется на заявленном производителем уровне ( $10^6$ – $10^8$  КОЕ/мл) не превышает 4 нед. В течение этого

**Таблица 1.** Микроорганизмы, использованные в настоящей работе

Организм	Источник
<i>Lactobacillus acidophilus</i> В-1660	Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ РАН)
<i>Lactobacillus casei</i> В-1144	ВКМ РАН
<i>Lactobacillus pentosus</i> В-1941	ВКМ РАН
<i>Lactococcus lactis</i> ТБ2	Коллекция ГосНИИ генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов
<i>Lactobacillus plantarum</i> (ИНМИ)	Выделен в процессе исследования
<i>Candida parapsilosis</i> (ИНМИ)	Выделен в процессе исследования

времени титр МКО в продукте снижается в 10 и более раз (Shin et al., 2000). О минимальном содержании МКО в молочнокислых и квашеных продуктах для проявления ими пробиотических свойств нет единого мнения. Титр  $10^8$  КОЕ/мл считается минимальным для реализации продуктом пробиотических свойств в толстом кишечнике и  $10^6$  КОЕ/мл – в тонком кишечнике (Minelli, Benini, 2008). Международными организациями здравоохранения и питания утвержден минимальный уровень содержания МКО в продуктах питания –  $10^7$  КОЕ/мл для общего количества МКО,  $10^6$  КОЕ/мл – для специальных групп молочнокислых бактерий,  $10^4$  КОЕ/мл – для дрожжей (Codex ..., 2003–2018).

Для продления жизнеспособности МКО самым распространенным способом является снижение температуры хранения продуктов и препаратов до близких к нулевым значениям, что увеличивает энергозатраты. Также для продления времени хранения МКО используют такие методы как селекция более устойчивых клонов (линий), инкапсулирование, изоляция от кислорода воздуха, применение стабилизирующих добавок и др. (Talwalkar, Kailasapathy, 2006).

Целью исследования было разработать технологически простые способы продления сроков сохранения жизнеспособности клеток молочнокислых организмов и сравнить их относительную эффективность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были музейные штаммы МКО и штаммы, выделенные авторами из ассоциации МКО, селективируемой в течение 6 мес. по признаку сохранения клетками жизнеспособности (колониеобразующей способности) в процессе хранения при комнатной температуре (табл. 1).

Молочнокислые бактерии и дрожжи культивировали в стерильном обезжиренном молоке в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды, на орбитальной качалке (100 об./мин) в течение 2 сут при температуре 28–30°C до стационарной фазы роста (чис-

ленность живых клеток составляла  $(2–11) \times 10^8$  КОЕ/мл). Инокулят – культуры стационарной фазы роста – вносили в количестве 5% (об./об.). При выращивании бинарных культур инокулят состоял из бактерий и дрожжей в пропорции 1 : 1 (по числу КОЕ).

Численность живых клеток определяли как количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл культуры при высеве аликвот (десятичных разведений) на агаризованную (1.5%) среду MRS (de Man et al., 1960).

Для хранения МКО в условиях доступа воздуха использовали микробиологические пробирки с ватно-марлевыми пробками, а для хранения в бескислородных условиях – пластиковые шприцы с герметично закупоренными иглами. Через определенные интервалы времени из хранящихся культур отбирали аликвоту для определения численности жизнеспособных клеток (КОЕ/мл). В смешанных культурах определяли удельное содержание организмов как микроскопически, так и методом посева на плотную среду MRS.

В качестве стабилизирующих добавок, которые вносили в стационарные культуры МКО, использовали: углеводы – крахмал или карбоксиметилцеллюлозу (3%), белки – желатин (5%), антиоксиданты – орцин (0.0025–0.05%) или гексилрезорцин (0.0005–0.0025%); молочный жир (5%). Все реактивы приобретены в “Sigma”, молочный жир был использован в виде 20% ультрапастеризованных сливок, приобретенных в розничной сети, стерильность которых предварительно была проверена посевом на плотные среды.

Все опыты выполнены в трех повторностях с тремя параллельными вариантами в каждой. На рисунках представлены средние значения, рассчитанные с применением пакета прикладных программ Excel 1997/2003.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ассоциацию длительно выживающих МКО выделили из рыночного молочнокислого продукта (простокваши) в процессе многократного пас-

сирования. В ультрапастеризованное обезжиренное молоко (50 мл в колбе объемом 250 мл) вносили инокулят в количестве 5% (об.), культуру инкубировали при 28–30°C в течение 2 сут на орбитальной качалке (100 об./мин). Через 2 сут культивирования наблюдали створаживание и закисление молока; титр МКО составлял  $(3–11) \times 10^8$  КОЕ/мл. Культуру хранили в течение 3 нед. при комнатной температуре в статическом режиме, после чего использовали как инокулят (5% по объему) для следующего цикла культивирования/селекции, как описано выше. Всего было проведено 10 циклов селекции. В итоге, через 6 мес. селекции, была получена ассоциация МКО, состоящая из двух организмов – бактерии и дрожжевого гриба. На основании культурально-морфологических свойств и определения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК (для бактерий) или 28S рРНК (для дрожжей) организмы чистых культур были идентифицированы как *Lactobacillus plantarum* и *Candida parapsilosis*. Монокультуры *L. plantarum* и *C. parapsilosis* и их бинарная культура, полученная при равной инокуляции обоих организмов (1 : 1 по КОЕ), были исследованы в течение 180 сут для определения скорости отмирания клеток (рис. 1).

Объектами сравнения были чистые культуры музейных штаммов молочнокислых бактерий (табл. 1, 2). Результаты определения численности жизнеспособных клеток (КОЕ) в процессе хранения культур МКО при температуре 17–25°C без применения каких-либо специальных приемов поддержания их жизнеспособности показали, что наибольшей скоростью отмирания характеризовались бактерии *Lactococcus lactis* (ВКМ) (0.4 lg КОЕ/сут), наименьшей – бинарная культура бактерий и дрожжей, изолированных из селективной ассоциации – *L. plantarum* и *C. parapsilosis*. Следует отметить, что музейные штаммы отмирали гораздо быстрее (КОЕ  $\sim 10^2$  кл./мл до 30 сут), чем штаммы, выделенные из ассоциации специально селективной по признаку длительного выживания (КОЕ  $\sim 10^2$  кл./мл до 60 сут). Наиболее важно, что в составе бинарной культуры эти штаммы выживали гораздо успешнее (КОЕ  $\sim 10^2$  кл./мл до 180 сут), чем при росте в монокультурах. При этом, во-первых, суммарная численность клеток МКО в бинарной культуре в стационарной фазе (7 сут роста) была на порядок больше, чем в монокультурах, а кривая отмирания не была монотонной; во-вторых, при хранении в течение 90 сут численность КОЕ в бинарной культуре *L. plantarum*–*C. parapsilosis* сохранялась на уровне  $10^8$  КОЕ/мл. В-третьих, в культуре, изначально содержащей равные концентрации клеток бактерий и дрожжей, произошли изменения в их удельном содержании – доля бактерий снизилась до 25–30%, а доля дрожжей возросла до 70–75%. Отметим, что удельное содержание кисломолочных бактерий и дрожжей

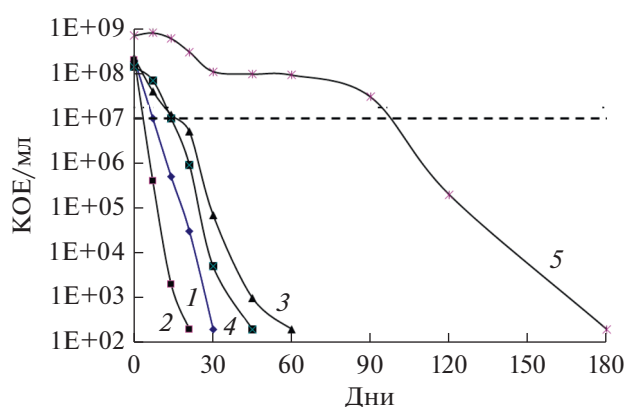


Рис. 1. Изменение численности жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) молочнокислых организмов при хранении в течение 6 мес.: 1 – *L. acidophilus* (ВКМ); 2 – *Lactococcus lactis* (ВКМ); 3 – *L. plantarum*; 4 – *C. parapsilosis*; 5 – ассоциация *L. plantarum* и *C. parapsilosis*. Пунктирной горизонтальной линией отмечен уровень КОЕ, соответствующий  $10^7$  кл./мл, утвержденный международными организациями здравоохранения и питания как минимальный в продуктах питания.

было выше рекомендуемого (Codex... 2003–2018), где численность МКБ установлена в пределах не ниже  $10^6$  кл./мл, а дрожжей –  $10^4$  кл./мл.

Клетки в бинарной культуре отмирали в течение 30 сут со скоростью 0.04 lg КОЕ/мл сут, что в 3–4 раза медленнее, чем в монокультурах (табл. 2). Затем, до 90 сут хранения, численность жизнеспособных клеток стабилизировалась на уровне  $10^7$ – $10^8$  кл./мл, более высоком, чем рекомендованный как минимальный для содержания МКО в продуктах питания. После 90 сут хранения скорость отмирания бинарной культуры возросла до 0.06 и поддерживалась на этом уровне до 180 сут хранения. Наличие такого плато в период 30–90 сут хранения может быть обусловлено образованием в бинарной культуре клеток-персистеров (Michiels, Fauvart, 2016) и покоящихся цистоподобных клеток (ЦПК), формирование которых в циклах развития периодических культур было показано ранее как для молочнокислых бактерий (Лойко и соавт., 2015), так и дрожжей (Эль-Регистан и соавт., 2006). Высокая численность покоящихся форм в хранящейся бинарной культуре, составляющая 10–15% от численности клеток в стационарной культуре, показана впервые и, по-видимому, может быть следствием межклеточных взаимодействий при совместном культивировании бактерий и дрожжей. Последующее снижение численности КОЕ (через 90 сут хранения) может объясняться переходом покоящихся клеток в некультивируемое состояние в примененных условиях хранения при доступе кислорода при комнатной температуре, что создает возможность

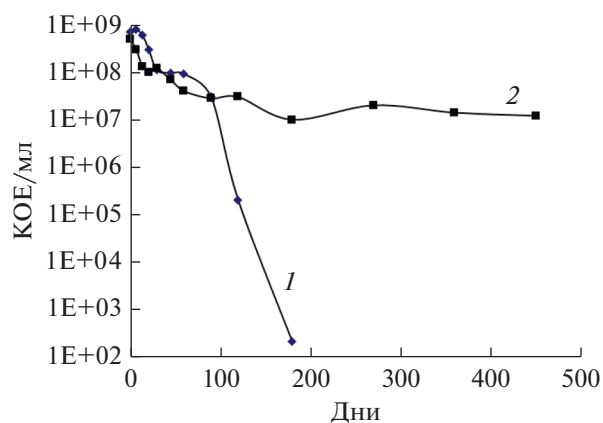
**Таблица 2.** Скорости отмирания клеток МКО при хранении их культур в течение 30 сут. Скорость отмирания выражена в единицах lg (КОЕ/мл)/сут

Организм (ассоциация)	Скорость отмирания, lg(КОЕ)/мл/сут
<i>L. acidophilus</i> В-1660	0.19
<i>Lactococcus lactis</i> ТБ2	0.36
<i>L. plantarum</i> ИНМИ	0.13
<i>C. parapsilosis</i> ИНМИ	0.17
<i>L. plantarum</i> — <i>C. parapsilosis</i>	0.04

образования активных форм кислорода и постоянного окислительного стресса.

Исходя из этого в следующих экспериментах выросшую бинарную культуру 30-сут возраста помещали в условия отсутствия доступа кислорода воздуха при хранении в герметично закрытых пластиковых шприцах. Результаты, представленные на рис. 2, свидетельствуют, что хранение в условиях ограниченного доступа воздуха радикально изменяет скорость снижения численности КОЕ, что является показателем отмирания клеток микроорганизмов. Так, при хранении в течение 6 мес. в условиях свободного доступа воздуха титр (численность КОЕ) МКО снизился до уровня  $10^2$  КОЕ/мл, тогда как при хранении в течение 15 мес. в условиях ограниченного доступа воздуха численность колониеобразующих клеток стабилизировалась на уровне  $1.2\text{--}1.4 \times 10^7$  КОЕ/мл, рекомендованном для титра МКО в продуктах питания (Codex... 2003—2018).

В третьей серии экспериментов были применены способы дополнительной стабилизации клеток МКО, основанные на применении стабилизирующих

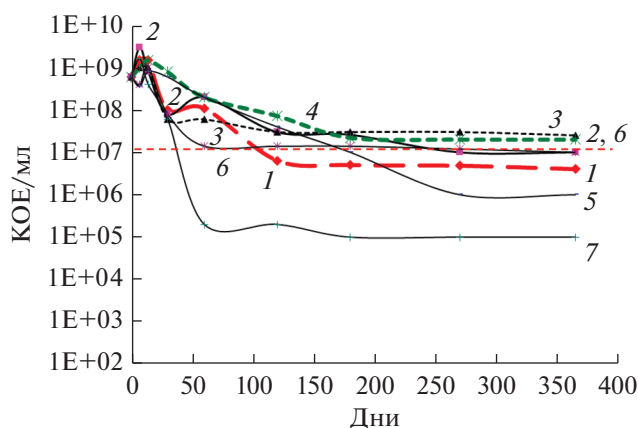


**Рис. 2.** Выживание клеток в бинарной культуре молочнокислых бактерий *L. plantarum* и дрожжей *C. parapsilosis* (при их начальной удельной доле в культуре по 50%) в условиях хранения: 1 — с доступом воздуха; 2 — с ограничением доступа воздуха.

щих добавок, в качестве которых были использованы: антиоксиданты (орцин и гексилрезорцин), полимеры углеводной и белковой природы (крахмал, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) и желатин), а также молочный жир. На рис. 3 представлены результаты хранения бинарных культур молочнокислых бактерий и дрожжей в течение 12 мес. при комнатной температуре в присутствии разных стабилизирующих добавок. При анализе результатов принимали за 100% (контроль) численность КОЕ в культурах без стабилизирующих добавок, хранящихся 2 и 12 мес. (табл. 3). Значимое влияние стабилизирующих добавок было выявлено преимущественно для вариантов 12-мес. хранения: для гексилрезорцина и желатина — увеличение КОЕ в 2 раза, для орцина и крахмала — в 5–6 раз. Однозначно негативно влияло добавление молочного жира: количество КОЕ снижалось на 1–2 порядка, что, по-видимому, связано со способностью жиров окисляться с образованием долгоживущих перекисей, повреждающих клеточные мембраны.

Полученные результаты согласуются с литературными данными. Известны такие приемы повышения стрессоустойчивости и выживания молочнокислых бактерий, как ограничение доступа воздуха, комбинированный рост молочнокислых бактерий, применение стабилизирующих добавок и защитных сред (Talwalkar, Kailasapathy, 2006; Dijkstra et al., 2018). Например, для защиты от повреждений при сушке МКБ применяют способы их выращивания в высококонцентрированном сусле (Huang et al., 2018).

Показано, что молочнокислые бактерии *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* и дрожжи *S. cerevisiae* дают больший выход биомассы при совместном



**Рис. 3.** Хранение ассоциации молочнокислых бактерий *L. plantarum* и дрожжей *C. parapsilosis* в условиях ограниченного доступа воздуха в течение 12 мес. при комнатной температуре в присутствии разных стабилизирующих добавок: 1 — контроль; 2 — гексилрезорцин (0.0005%); 3 — орцин (0.0025%); 4 — крахмал (3%); 5 — КМЦ (3%); 6 — желатин (5%); 7 — молочный жир (5%).

**Таблица 3.** Численность КОЕ в бинарной культуре МКО без добавок (контроль) и в присутствии разных стабилизирующих добавок через 2 и 12 мес. хранения в условиях отсутствия доступа воздуха

Срок хранения	Контроль	ГР	Орцин	Крахмал	КМЦ	Желатин	Жир
2 мес.	100%	181.8	54.5	181.8	181.8	12.7	0.2
12 мес.	100%	250.0	625.0	500.0	25.0	250.0	2.5

культивировании, что можно объяснить обменом азотистыми метаболитами, лежащим в основе мутуалистических взаимоотношений симбионтов (Ponomarova et al., 2017).

В работе Ng et al. (2011) показано, что совместное культивирование ряда штаммов молочнокислых бактерий повышало степень выживаемости *Lactococcus lactis*. Однако имеются данные о селективности таких взаимодействий: если некоторые штаммы повышали выживаемость целевого штамма МКБ, то другие бактерии действовали негативно (Vinderola et al., 2002). При этом отмечено, что для проявления положительного влияния совместного культивирования необходимо присутствие живых клеток, а не только их метаболитов (Ng et al., 2011). По-видимому, помимо трофических взаимодействий, на выживаемость МКБ влияют метаболиты, регулирующие образование стрессоустойчивых клеток, предназначенных для выживания популяций (Николаев и соавт., 2006).

Таким образом, в результате проведенных исследований, имеющих целью повышение жизнеспособности молочнокислых организмов, предложен новый алгоритм последовательного применения микробиологических и биохимических приемов, применение которых обеспечивает существенное снижение скорости отмирания клеток МКО:

- использование природных ассоциаций молочнокислых организмов для выделения штаммов МКО, естественно адаптированных к сокультивированию;

- селекция природных ассоциаций МКО по заданному технологическому свойству, в настоящем исследовании – по признаку длительности сохранения жизнеспособности клеток;

- ограничение доступа воздуха в процессе хранения культур/продуктов на основе МКО;

- внесение стабилизирующих добавок (антиоксидантов, полимеров углеводной и белковой природы) в хранящиеся в отсутствие доступа кислорода бинарные (многокомпонентные) культуры МКО.

Кроме того, впервые показано, что дрожжевым компонентом стабильной ассоциации с молочнокислыми бактериями является *C. parapsilosis*.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лойко Н.Г., Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневиц А.И., Ганина В.И., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков // Микробиология. 2014. Т. 83. № 3. С. 284–294.
- Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Y.A., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I., Krasnova M.A., Pichugina T.V., Grinevich A.I., Ganina V.I. Changes in the phase variant spectra in the population of lactic acid bacteria under antibiotic treatment // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 195–204.
- Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 489–496.
- Nikolaev Yu.A., Mulyukin A.L., Stepanenko I.Yu., El'-Registan G.I. Autoregulation of stress response in microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 420–426.
- Олескин А.В., Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. 2016. Т. 85. № 1. С. 3–25.
- Oleskin A.V., El'-Registan G.I., Shenderov B.A. Role of neuromediators in the functioning of the human microbiota: "business talks" among microorganisms and the microbiota–host dialogue // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 1–22.
- Рогожин В.В., Рогожин Ю.В. *Medusomyces gisevii*: строение, функционирование и использование // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. № 4. С. 24–35.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуба В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорга-

низмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456.

*El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Galchenko V.F., Suzina N.E., Duda V.I.* Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.

*Юркевич Д.И., Кутышенко В.П.* Медузомицет (Чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма // Биофизика. 2002. Т. 47. № 6. С. 1116–1129.

*Yurkevich D.I., Kutyshenko V.P.* Meduzomyces (Tea fungus): scientific history, composition, physiology and metabolism // Biophysics. 2002. V. 47. P. 1116–1129.

Codex standard for fermented milks. Codex standard 243-2003. Adopted in 2003. Revised in 2008, 2010, 2018. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>

*de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E.* A medium for the cultivation of lactobacilli // Appl. Bact. 1960. V. 23. P. 130–135.

*Dijkstra A.R., Starrenburg M.J.C., Todt T., van Hijum S.A.F.T., Hugenholtz J., Bron P.A.* Transcriptome analysis of a spray drying-resistant subpopulation reveals a zinc-dependent mechanism for robustness in *L. lactis* SK11 // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Article 2418.

*Huang S., Gaucher F., Cauty C., Jardin J., Le Loir Y., Jeantet R., Chen X.D., Jan G.* Growth in hyper-concentrated sweet whey triggers multi stress tolerance and spray drying survival in *Lactobacillus casei* BL23: from the molecular basis to new perspectives for sustainable probiotic production // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Article 2548.

*Lantinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., Wright A.V.* Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 4th edn. CRC Press, 2012. 798 p.

*Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezal N., Garaizar J.* Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities // Rev. Iberoam. Micol. 2006. V. 23. № 2. P. 67–74.

*Michiels J., Fauvart M.* (Eds.). Bacterial Persistence. Methods and Protocols. Belgium, Humana Press, 2016. 244 p.

*Minelli E.B., Benini A.* Relationship between number of bacteria and their probiotic effects // Microb. Ecol. Health Dis. 2008. V. 20. P. 180–183.

*Ng E.W., Yeung M., Tong P.S.* Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus* // Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 145. P. 169–175.

*Ponomarova O., Gabrielli N., Sévin D.C., Müllleder M., Zirnigibl K., Bulyha K., Andrejev S., Kafkia E., Typas A., Sauer U., Ralser M., Patil K.R.* Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow // Cell Syst. 2017. V. 5. P. 345–357.

*Shin H.-S., Lee J.-H., Pestka J.J., Ustinol Z.P.* Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage // J. Food Protect. 2000. V. 63. P. 327–331.

*Sonomoto K., Yokota A.* (Eds.). Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research. Caister Academic Press, 2011. 286 p.

*Talwalkar A., Kailasapathy K.* A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques // Compr. Rev. in Food Sci. and Food Safety. 2006. V. 3. P. 117–124.

*Thomas T.D., Batt R.D.* Survival of *Streptococcus lactis* in starvation conditions // J. Gen. Microbiol. 1968. V. 50. P. 367–382.

*Vinderola C.G., Mocchiutti P., Reinheimer J.A.* Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products // J. Dairy Sci. 2002. V. 85. P. 721–729.

## Approaches to Enhancing the Viability of Lactic Acid Microorganisms

Yu. A. Nikolaev<sup>1,\*</sup>, E. F. Shanenko<sup>2</sup>, and G. I. El'-Registan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup>Moscow State University of Food Production, Moscow, 125080 Russia

\*e-mail: NikolaevYA@mail.ru

Received March 18, 2019; revised March 31, 2019; accepted May 25, 2019

**Abstract**—Approaches to stabilizing the cells of lactic acid organisms (LAO) investigated in the present work resulted in maintaining the viable cell titer at  $10^7$ – $10^8$  cells/mL, the value recommended for the LAO titer in foodstuffs, for 12 months. Natural LAO associations selected for long-term preservation of LAO cell viability exhibited high efficiency. Lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and yeasts *Candida parapsilosis* were isolated from the association isolated from market curdled milk and selected for 6 months. The death rate of these LAO in binary culture (50% of each component) was several times lower than in monocultures. Adding other approaches for cell stabilization in a binary LAO culture (anoxic conditions and stabilizing antioxidant and biopolymer supplements) resulted in a 5- to 6-fold increase in the number of viable cells after 12-month storage. The algorithm for combined application of several approaches to prolongation of cell viability in the cultures of lactic acid microorganisms during long-term storage (up to 12 months) was not reported previously. It may be recommended for LAO cell stabilization both in fermented milk products and in leaven cultures. This is the first report of *C. parapsilosis* as the yeast component of a stable association with lactic acid bacteria.

**Keywords:** lactic acid microorganisms, binary cultures, *Lactobacillus plantarum*, *Candida parapsilosis*, viability prolongation, cell stabilization