

И.С. Хамагаева, д-р техн. наук, проф., зав. кафедрой
«Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров»
А.Х. Цыбикова, аспирант кафедры «Технология молочных продуктов.
Товароведение и экспертиза товаров»
Н.А. Замбалова, канд. экон. наук, ст. преп. кафедры
«Метрология, стандартизация и сертификация»
Восточно-Сибирский государственный технологический университет
Тиансонг Сан, проф.
Сельскохозяйственный государственный университет,
Внутренняя Монголия, Н.Р. Китай

УДК 637.136:664.87:665.238

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА КАЧЕСТВО БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА С ХОЛЕСТЕРИНМЕТАБОЛИЗИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

*Представлены результаты научно-исследовательской работы по изучению сочетаемости штамма *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ с *Propionibacterium shermanii* AC 2503. Подобраны оптимальные условия культивирования симбиотической закваски и изучена ее биохимическая активность. Разработана технология комбинированного бактериального концентрата в жидкой форме с высокой антимуtagenной и холестеринметаболизирующей активностью.*

Ключевые слова: лактобактерии, пропионовокислые бактерии, холестерин, симбиотическая закваска, комбинированный бактериальный концентрат.

I.S. Khamagaeva, Dr. Sc. Engineering, Prof., **A.Kh. Tsybikova**, P.G.
N. A. Zambalova, Cand. Sc. Economics, **S. Tiansong**, Prof.

EFFECT OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE QUALITY BACTERIAL CONCENTRATE REDUCES CHOLESTEROL

*The article presents the results of scientific research on the compatibility of the strain *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ with *Propionibacterium shermanii* AC 2503. The authors selected the optimal conditions for cultivation of symbiotic yeast and studied its biochemical activity. A technology of combined bacterial concentrate in liquid form with high antimutagenic and cholesterol metabolic activity is worked out.*

Key words: lactobacilli, propionic acid bacteria, cholesterol, symbiotic yeast, combined bacterial concentrate.

Введение

В последнее время сердечно-сосудистые заболевания продолжают оставаться основной причиной смертности и инвалидности населения, вызывая наибольшее количество социальных и экономических потерь. По сравнению с развитыми странами Запада в России показатель сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности оказался в пять-шесть раз выше. На сегодняшний день установлено более 200 факторов риска, но наиболее распространенными и значимыми являются высокие цифры артериального давления и повышенный уровень холестерина. Результаты исследований, проведенных в Государственном научно-исследовательском центре профилактической медицины, показывают, что около 40% населения России в возрасте 30 лет и старше имеют те или иные факторы риска. В нашей стране от болезней, вызванных атеросклерозом, умирает более 50% людей в возрасте старше 30 лет. Материальный ущерб при этом не поддается исчислению.

Необходимо отметить, что важнейшая роль в профилактике и коррекции нарушений липидного обмена, предупреждении прогрессирования уже развившихся атеросклеротических поражений сосудов принадлежит применению системных продуктов здоровья на основе пробиотических микроорганизмов.

Анализ опубликованных в литературе данных о биологически активных соединениях, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами, показал, что до настоящего времени биотехнологический потенциал анаэробных микроорганизмов бифидобактерий, пропионовокислых и лактобактерий практически не используется. Между тем не вызывает сомнения, что эти микроорганизмы являются новым источником промышленного получения ценных метаболитов в биопродуктах. Важность проведения исследований в области микробной экологии, изучения мутагенеза, метаболизма холестерина пробиотическими микроорганизмами определяется необходимостью создания биопродуктов массового потребления для

поддержания и сохранения здоровья населения, которые составят достойную конкуренцию традиционным лекарственным средствам. Механизм лечебно-профилактического действия пробиотиков является многогранным и обусловлен не только высоким содержанием жизнеспособных клеток, но и синтезом внеклеточных метаболитов, усиливающих пробиотический эффект. Экзометаболиты пробиотических микроорганизмов подавляют рост патогенной микрофлоры, обладают радиопротекторными, противоопухолевыми, дисмутагенными, иммунокорректирующими, холестеринметаболизирующими и др. свойствами [1, 2]. Потенциальная возможность к накоплению биологически активных веществ пробиотическими микроорганизмами различна, зависит от видовой и штаммовой принадлежности и проявляется в определенных условиях. Это свидетельствует о перспективности изучения прокариот как источников биологически активных веществ для создания продуктов нового поколения.

Целью данной работы является подбор условий культивирования пропионовокислых бактерий и лактобацилл для получения комбинированного бактериального концентрата с высокой антимутагенной и холестеринметаболизирующей активностью.

Объекты и методы исследований

Объектом исследований служили чистые культуры пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* AC 2503, полученные из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (Москва), активизированные уникальным биотехнологическим методом, разработанным в ВСГТУ, и *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ Генетика.

Культивирование микроорганизмов проводили на разработанной нами питательной среде на основе молочной сыворотки [3], в которую добавляли 1% очищенной сыворотки крови человека. Сыворотку крови получали с МУЗ «Бурятская республиканская станция переливания крови». В качестве контроля использовали питательную среду без добавления сыворотки крови. Накопление биомассы микроорганизмов проводили путем периодического культивирования при 30°C. Рост культур оценивали по изменению оптической плотности $\lambda = 550$ нм на фотоэлектроколориметре. Титр жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий определяли по числу КОЕ при высеве клеточной суспензии на среду ГМК, а лактобацилл на среду MRS.

Для определения уровня холестерина использовали ферментативный метод [4]. Принцип метода заключается в том, что под действием фермента холестеринэстеразы эфиры холестерина распадаются на холестерин и перекись водорода. Далее холестерин под воздействием холестериноксидисмутазы дает окрашенное соединение. Интенсивность окраски в реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе. Концентрацию холестерина в пробе определяли расчетным методом. Биосинтез экзополисахаридов (ЭПС) определяли антроновым методом [5], антимутагенную активность определяли по тесту Эймса [6], адгезивные свойства по методу Брилис [7].

Результаты и их обсуждение

При соединении штаммов разных видов бактерий важно добиться их сочетаемости, взаимного стимулирования и обеспечения активного роста заквасочных культур. На основании скрининга различных видов и штаммов пробиотических микроорганизмов нами были выбраны заквасочные культуры *P. shermanii* AC 2503 и *L. helveticus* 3₅₋₁, обладающие наиболее высокой холестеринметаболизирующей активностью для создания комбинированного бактериального концентрата. Ранее нами установлено, что наиболее благоприятными условиями для совместного культивирования *P. shermanii* AC 2503 и *L. helveticus* 3₅₋₁ являются соотношение 95:5 и температура 30°C. При этом отмечается сбалансированный рост микроорганизмов, выраженная холестеринметаболизирующая активность, умеренная кислотность, активность ферментации молока 10-12 ч и высокое количество жизнеспособных клеток [8]. Характеристика инокулята представлена в таблице 1.

Таблица 1

Качественная характеристика комбинированного инокулята

Показатель	Характеристика
Внешний вид и консистенция	Однородная, в меру плотная, без отстоя сыворотки
Вкус и запах	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Молочно-белый или с кремовым оттенком
Продолжительность ферментации, ч	10-12
Кислотность, °Т	80±1

Продолжение таблицы 1

Активная кислотность, pH	4,72
Холестеринметаболизирующая активность, %	89,41±0,1
Количество жизнеспособных клеток <i>P. shermanii</i> , КОЕ в 1 см ³	2*10 ⁹
Количество жизнеспособных клеток <i>L. helveticus</i> , КОЕ в 1 см ³	1*10 ⁹
Контаминация	отсутствует

Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о высокой холестеринметаболизирующей активности инокулята. Исследования показали, что сочетание микроорганизмов в комбинированной закваске повышает ее холестеринметаболизирующую активность.

В дальнейших исследованиях изучали влияние условий культивирования на рост комбинированной закваски. Следует отметить, что доза вносимого инокулята должна обеспечивать начало роста микроорганизмов с минимальной лаг-фазой. Нами было установлено, что оптимальная плотность популяций и рост микроорганизмов достигаются при внесении 3 % инокулята. Результаты исследований представлены на рисунке.

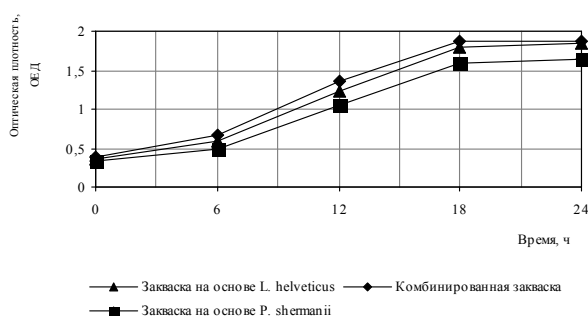


Рис. Рост биомассы пробиотических микроорганизмов в процессе культивирования

Таблица 2

Качественная характеристика комбинированного бактериального концентрата в жидкой форме

Показатель	Характеристика
1	2
Вкус и запах	Чистый, слегка кисловатый, без посторонних привкусов и запахов
Консистенция и внешний вид	Однородная, с незначительным отстоем сыворотки
Цвет	От белого до светло-желтого
Предельные значения pH	4,6-4,8
Температура при выпуске с предприятия, °С	4-6
Количество клеток, КОЕ/см ³	
<i>L. helveticus</i> 3 ₅₋₁	2*10 ¹¹
<i>P. shermanii</i> AC 2503	1*10 ¹¹
Холестеринметаболизирующая активность, %	93,51±0,1
Антимутагенная активность (ингибирование), %	50,4
Адгезивные свойства:	
СПА	4,8
КУЭ, %	86
ИАМ (M+m)	5,58±1,1
Биосинтез экзополисахаридов, мкг/мл	1,08
Объем продукта (см ³), в котором не допускаются:	
БГКП (колиформы)	10
<i>S. aureus</i>	10
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	50
Дрожжи, КОЕ/см ³ , не более	10
Плесени, КОЕ/см ³ , не более	10

Из рисунка видно, что максимальный прирост биомассы заквасочных культур достигается к 18 часам культивирования, т.е. к концу экспоненциальной фазы развития, затем следует стационарная фаза,

где наблюдается остановка роста микроорганизмов. Следует отметить наиболее активный рост бактериальной массы при культивировании комбинированного инокулята, что свидетельствует о сочетаемости заквасочных культур и их взаимном стимулировании. Это, вероятно, объясняется высокой протеолитической активностью культуры *L. helveticus*, которая расщепляет белковые компоненты в питательной среде с образованием пептидов и аминокислот и создает благоприятные условия для роста пропионово-кислых бактерий.

В результате проведенных исследований выбраны оптимальные технологические параметры производства бактериального концентрата с холестеринметаболизирующими свойствами. Характеристика концентрата представлена в таблице 2.

Из данных таблицы 2 видно, что концентрат обладает высокой холестеринметаболизирующей, антимуtagenной и адгезивной активностью, синтезирует экзополисахариды и содержит высокое количество жизнеспособных клеток пробиотических микроорганизмов. Учитывая высокие пробиотические свойства концентрата в жидкой форме, его можно рекомендовать в качестве биологически активной добавки к пище для лечения и профилактики заболеваний, вызванных повышенным уровнем холестерина в крови.

Выводы

В результате проведенных исследований подобраны условия совместного культивирования *P. shermanii* AC 2503 и *L. helveticus* 3₅₋₁ и разработан комбинированный бакконцентрат в жидкой форме, обладающий высокими антимуtagenными и холестеринметаболизирующими свойствами.

Библиография

1. Chen, Y.S., Christensen J.E., Broadbent J.R., and Steele J.L. 2003. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus*, an endopeptidase with post-proline specificity. Appl. Environ. Microbiol. 69:1276-1282.
2. Slattery, L. Invited review: *Lactobacillus helveticus* - A thermophilus dairy starter related to gut bacteria [Текст] / L. Slattery, J.O.'Callaghan, G.F. Fitzgerald, T. Beresford, R.P. Ross // Journal of Dairy Science. -2010. - № 10. –С. 4435-4456.
3. Хамагаева, И.С. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий [Текст] / И.С. Хамагаева, Л.М. Качанина, С.М. Тумурова. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 172 с.
4. Бальябина М.Д., Слепышева В.В., Козлов А.В. Методы определения холестерина. - М.: Гепатология, 2004. - Т. 6, №6. - С. 21-39.
5. Пирог, Т.П. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acetobacter* sp. [Текст] / Т.П. Пирог, Т.А. Гринберг, Ю.Р. Малашенко // Микробиология. – 1997. – Т.66, №3. – С.335-340.
6. Воробьева, Л.И. Антимуtagenность пропионовокислых бактерий[Текст] / Л.И. Воробьева // Микробиология. – 1991. – Т. 60, №56. – С.83-89.
7. Брилис, В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов [Текст] / В.И. Брилис, Т.А. Брилене, Х.П. Ленцнер, А.А. Ленцнер // Лабораторное дело. – 1986. - №4. –С. 210-214.
8. Хамагаева, И.С. Исследование биохимической активности комбинированной закваски на основе *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ и *Propionibacterium shermanii* AC2503 [Текст] / И.С. Хамагаева, А.Х. Цыбикова // XII международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства». - Йошкар-Ола, 2010. – С. 307-308.

Bibliography

1. Chen, Y.S., Christensen J.E., Broadbent J.R., and Steele J.L. 2003. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus*, an endopeptidase with post-proline specificity. Appl. Environ. Microbiol. 69:1276-1282.
2. Slattery, L. Invited review: *Lactobacillus helveticus* - A thermophilus dairy starter related to gut bacteria [Text] / L. Slattery, J.O.'Callaghan, G.F. Fitzgerald, T. Beresford, R.P. Ross // Journal of Dairy Science. -2010. - № 10. –С. 4435-4456.
3. Khamagaeva, I.S. Biotechnology of propionic acid bacteria starter cultures [Text] / I.S. Khamagaeva, L.M. Kachanina, S.M. Tumurova. - Ulan-Ude: ESSTU, 2006. – 172 p.
4. Balyabina M.D., Slepysheva V.V., Kozlov A.V. Methods for determination of cholesterol. - M.: Hepatology, 2004. -Vol. 6, № 6. - P. 21-39.
5. Pirog, T.P. Protective functions of exopolysaccharides synthesized by bacteria *Acetobacter* sp. [Text] / T.P. Pirog, T.A. Grinberg, U. R. Malashenko // The Microbiology. – 1997. – Vol. 66, №3. –P. 335-340.
6. Vorobyeva, L.I. Antimutagenicity of propionic acid bacteria [Text] / L.I. Vorobyeva // The Microbiology. – 1991. Vol. 60, №56. –P. 83-89.
7. Brilis V.I. Method for studying the adhesive process of microorganisms [Text] / V.I. Brilis, T.A. Brilene, Kh.P. Lentsner, A.A. Lentsner // The Laboratory work. – 1986. - №4. –P. 210-214.
8. Khamagaeva I.S. Investigation of the biochemical activity of the combined starter on *Lactobacillus helveticus* 3₅₋₁ and *Propionibacterium shermanii* AC 2503 [Text] / I. S. Khamagaeva, A.Kh. Tsybikova // - XII international scientific and practical conference “Topical issues of improving the technology of production and processing of agricultural products”. – Yoshkar-Ola , 2010. – P. 307-308.