

И.С. Хамагаева, д-р техн. наук, проф.

С.Н. Хазагаева, аспирант

Н.А. Замбалова, докторант

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ

E-mail: tmpp@eestu.ru

УДК 579.873.13

СОЗДАНИЕ КОНСОРЦИУМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ВЫСОКОЙ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ЭКЗОПОЛИСАХАРИДНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

В статье представлены результаты исследований биотехнологического и экзополисахаридного потенциала пробиотических микроорганизмов. Определены условия совместного культивирования бифидо-, лакто- и пропионовокислых бактерий для создания консорциума с высокими функционально-технологическими свойствами.

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, комбинированная закваска, экзополисахариды, селенит натрия.

S.N. Khazagaeva, P.G.

N.A. Zambalova

I.S. Khamagaeva, Dr. Sc. Engineering, Prof.

CREATION OF A PROBIOTIC MICROORGANISMS CONSORTIUM WITH HIGH BIOCHEMICALLY ACTIVE EXOPOLYSACCHARIDE POTENTIAL

The article presents the results of studies and biotechnological and exopolysaccharide potential of probiotic microorganisms. The optimal conditions for joint cultivation of bifidobacteria, lactobacilli and propionic acid bacteria to create a consortium with high functional and technological properties are defined.

Key words: probiotic, symbiotic starter, exopolysaccharide, sodium selenite.

Производство пробиотических молочных продуктов, сохраняющих стабильные показатели качества при хранении, является одной из важнейших задач пищевой промышленности. Интенсивное расширение ассортимента продуктов привело к использованию в технологии пищевых добавок. Для улучшения реологических характеристик и увеличения срока годности применяют стабилизаторы, консерванты и антиоксиданты различного происхождения. Однако до последнего времени не решены все аспекты биобезопасности, возникающие при использовании в производстве продуктов питания пищевых добавок.

В последние годы за рубежом внимание акцентируется на новых стартовых культурах, синтезирующих экзополисахариды, которые не только являются натуральной альтернативой пищевым добавкам, улучшающим реологические показатели пищевых продуктов, но и выступают в роли факторов, способствующих адгезии полезных микроорганизмов на стенках кишечника. Особый интерес к ЭПС-активным культурам пробиотических микроорганизмов обусловлен тем, что на международном уровне молочнокислым и бифидобактериям присвоен высокий статус безопасности, что подтверждает возможность применения ЭПС-продуцирующих штаммов этих микроорганизмов в производстве безопасных продуктов питания.

Целью работы является разработка бактериального концентрата для производства пробиотической сметаны с стабильными качественными характеристиками

Объекты и методы исследований

Объектами исследований служили чистые культуры пробиотических бактерий: штамм *Propionibacterium freundenreichii subsp. shermanii* AC-2503, полученный из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (Москва), штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium longum* DK 100, *Bifidobacterium bifidum* 8₃, *Bifidobacterium longum* B379M, активизированные уникальным биотехнологическим методом, разработанным в ВСГУТУ, и штаммы молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 18П, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 24₄, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* T-18-20, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика».

Для культивирования пробиотических микроорганизмов применяли питательную среду на основе осветленной сыворотки с внесением ростовых компонентов, разработанную в ВСГУТУ.

Для определения стандартных показателей применяли методики, регламентируемые ГОСТ. Количественное определение экзополисахаридов – колориметрическим фенол-кислотным методом; рост биомассы фотоколориметрическим методом на спектрофотометре PD-101 APEL при $\lambda=550$ нм; количественный учет бифидобактерий и пропионовокислых бактерий – по МУК 4.2.999-00.

Результаты и их обсуждение

Отбор штаммов по производственно-ценным свойствам – важный аспект разработки пробиотического продукта. На начальном этапе исследований был изучен биотехнологический потенциал пробиотических микроорганизмов. При выборе штаммов учитывали стабильность технологических и функциональных свойств, таких как органолептические свойства, способность к накоплению биомассы, способность к образованию вязких сгустков посредством синтеза экзополисахаридов, а также соответствие критериям, предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам. Консистенция – один из определяющих показателей качества сметаны. Поэтому при отборе культур для комбинированной закваски необходимо изучить степень продуцирования полисахаридов исследуемыми штаммами. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Полисахаридный потенциал микроорганизмов

Объект исследования	Относительная вязкость культуральной жидкости, сСт	Концентрация полисахаридов, мкг/см ³
<i>P. freundenreichii subsp. freundenreichii</i> AC-2500	1,88	19,70±0,61
<i>P. cyclohexanicum kusano</i> AC-2560	3,86	29,60±0,43
<i>P. freundenreichii subsp. schermanii</i> AC- 2503	4,45	30,2±0,26
<i>Bifidobacterium longum</i> DK -100	1,92	5,9±0,04
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 8 ₃	2,41	7,8±0,021
<i>Bifidobacterium longum</i> B379 M	2,4	7,5±0,03
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> 24 ₄	4,62	23,8±0,21
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> 18П	4,45	18,3±0,17
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> T-18-20	4,57	19,6±0,31

Наибольшую способность к продуцированию экзополисахаридов обнаружили штаммы *Propionibacterium freundenreichii subsp. shermanii* AC- 2503, *Bifidobacterium bifidum* 8₃ и *Lactococcus lactis subspecies cremoris* 24₄.

Биотехнологический потенциал штаммов пробиотических бактерий, выбранных в консорциум комбинированной закваски, представлен в таблице 2.

Как видно из данных таблицы 2, заквасочные культуры активно ферментируют молоко с образованием сгустков с хорошими органолептическими свойствами. Совокупность полу-

ченных результатов показывает, что изученные штаммы обладают высоким потенциалом жизнеспособности в желудочно-кишечном тракте, сохраняя при этом ферментативную активность.

Таблица 2

Биотехнологический потенциал пробиотических микроорганизмов

Показатели	<i>L. cremoris</i> 24 ₄	<i>B. bifidum</i> 8 ₃	<i>P. shermanii</i> AC-2503
Внешний вид и консистенция	однородная плотная вязкая	однородная в меру жидкая	однородная густая в меру вязкая
Вкус и аромат	чистый кисломолочный, нежный сливочный привкус	чистый нежный, кисломолочный	чистый кисломолочный слегка пряный
Активность ферментации, ч	10-12	12-14	12-14
Кислотность, титруемая, °Т активная, рН	74±2 4,92±0,03	67±2 4,98±0,02	72±2 4,95±0,01
Титр жизнеспособных клеток, КОЕ./см ³	6*10 ⁹	4*10 ⁹	5*10 ⁹
Рост клеток при 20% желчи	+	+	+
40% желчи	±	+	±
4% NaCl	±	+	+
рН=4,5	+	+	+
Устойчивость к фенолу	+	+	+
Продуцирование экзополисахаридов, мкг/см ³	23,8±0,64	7,8±0,12	30,2±1,04
Индекс адгезивности микроорганизма	4,28±0,15	4,22±0,21	5,4±0,09

В результате исследований установлено, что подобранные культуры пробиотических микроорганизмов удовлетворяют всем критериям пригодности и являются перспективными для использования в составе комбинированной закваски для производства кисломолочных биопродуктов.

При создании консорциума бифидо-, лакто- и пропионовокислых бактерий необходимо подобрать оптимальные параметры культивирования, при которых будет наблюдаться взаимное стимулирование, сбалансированный рост и стабильное равновесие культур, а также сохранение производственно-ценных свойств каждого представителя микробной ассоциации. Сложность составления консорциума заквасочных культур в данном случае заключается в том, что культуры, составляющие конструкцию закваски, нуждаются в различных температурных оптимумах и обладают неодинаковым темпом размножения. Оптимальное соотношение микроорганизмов в консорциуме выбирали с учетом сбалансированного роста культур и органолептических показателей сгустков. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сбалансированный рост всех микроорганизмов наблюдается при соотношении *B. Bifidum* 8₃, *L. Cremoris* 24₄:*P. Shermanii* AC-2503, равном 40:30:30. При этом сгусток характеризуется однородной в меру вязкой консистенцией и высокими органолептическими показателями. О хорошей сочетаемости и прочных симбиотических отношениях свидетельствует высокая плотность популяций культур, гарантирующая стабильность микробного консорциума.

Подобранные условия культивирования консорциума пробиотических микроорганизмов обеспечивают высокую биохимическую активность и хорошие органолептические показатели инокулята.

Закваски являются основополагающим фактором качества в производстве сметаны. Именно закваски придают продукту большинство характерных особенностей – вязкость, структуру сгустка, консистенцию, аромат, а также определяют стабильность качественных

показателей при хранении. Структура и консистенция кисломолочных продуктов в значительной степени зависят от способности заквасочных культур продуцировать внеклеточные полисахариды. Согласно литературным данным, синтез и качественный состав экзометаболитов бактерий зависят от условий культивирования. Известно, что при культивировании бифидобактерий и пропионовокислых бактерий на питательной среде с добавлением селенита натрия повышается вязкость культуральной жидкости и увеличивается концентрация экзополисахаридов [1, 3]. Что касается лактококков, то такая информация в литературе отсутствует. Поэтому на следующем этапе было изучено влияние различных доз селенита натрия на биосинтез ЭПС пробиотическими микроорганизмами. Результаты исследований представлены на рисунке 1.

Таблица 3

Качественная характеристика инокулята

Показатели	Характеристика
Консистенция и внешний вид	однородная, в меру вязкая, плотная
Вкус и аромат	нежный, чистый, кисломолочный
Активность ферментации, ч	10-12
Кислотность, °Т	70-72
Количество жизнеспособных клеток <i>B. Bifidum</i> 8 ₃ , КОЕ/см ³	5*10 ⁹
Количество жизнеспособных клеток <i>L. Cremoris</i> 24 ₄ , КОЕ/см ³	3*10 ⁹
Количество жизнеспособных клеток <i>P. Shermanii</i> , КОЕ/см ³	4*10 ⁹
Содержание ЛЖК, мг/100 г	3,8

Как видно из данных, представленных на рисунке 1, добавление селенита натрия в питательную среду стимулирует синтез экзополисахаридов. Наибольший прирост экзополисахаридов наблюдается в интервале концентраций селенита натрия от 10 до 30 мкг/см³. Дальнейшее увеличение концентрации селенита до 50 мкг/см³ не приводит к значительному повышению экзополисахаридов. Интересным является тот факт, что повышение концентрации селенита натрия в питательной среде не приводит к задержке роста микроорганизмов, и количество жизнеспособных клеток в конце культивирования составляет (10¹⁰-10¹¹) КОЕ/см³.

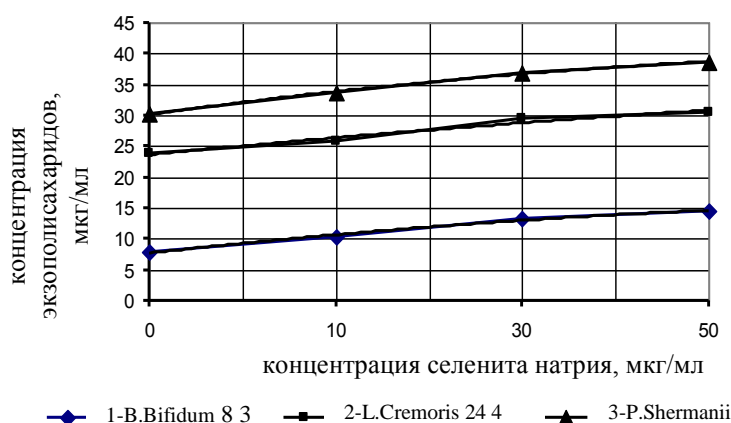


Рис 1. Влияние селенита натрия на биосинтез экзополисахаридов

Это свидетельствует о высокой устойчивости микроорганизмов к селениту натрия. Устойчивость к селену бактерий может быть обусловлена наличием ассоциированных с клетками полисахаридов, препятствующих проникновению селена в клетки, которые затем высвобождаются в среду. Из литературных источников известно о защитных биологических функциях ЭПС микроорганизмов, которые играют главную защитную роль, поскольку действуют гораздо быстрее по сравнению с индуцибельными системами защиты [2, 4].

В результате проведенных исследований выбрана оптимальная доза селенита натрия 30 мкг/см^3 , обеспечивающая высокое количество экзополисахаридов и активный рост микроорганизмов.

В дальнейших исследованиях изучали рост биомассы и синтез ЭПС при совместном культивировании *B. Bifidum* 8₃, *L. Cremoris* 24₄ и *P. Shermanii* AC-2503, взятых в соотношении 40:30:30 на питательной среде с добавлением селенита натрия в количестве 30 мкг/см^3 . Результаты исследований представлены на рисунке 2.

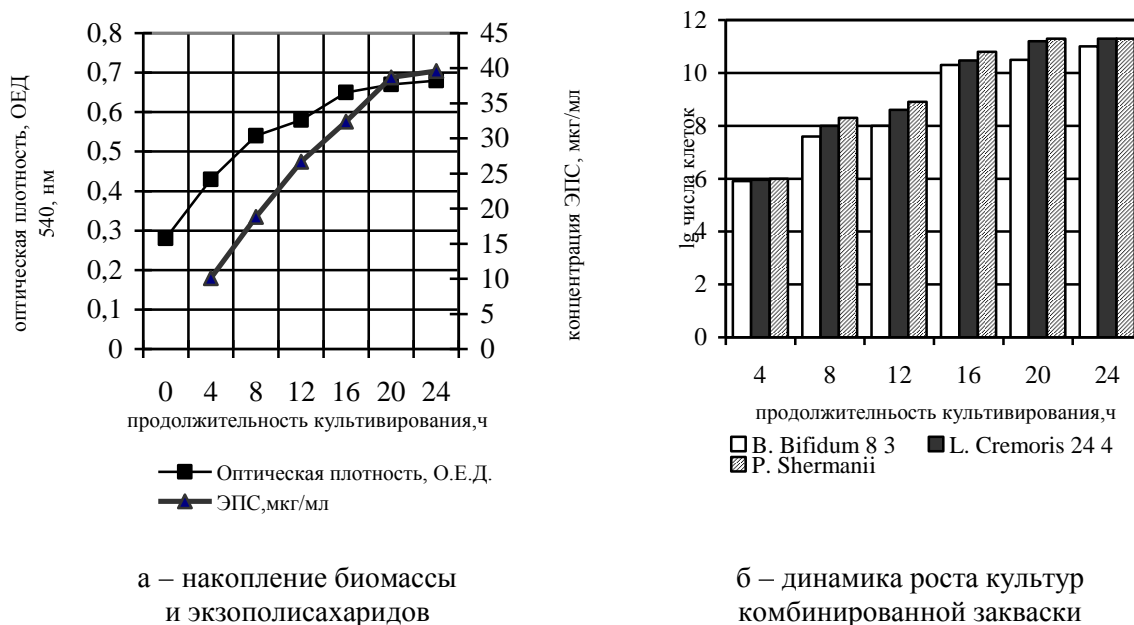


Рис 2. Влияние селенита натрия на накопление биомассы и синтез экзополисахаридов культурами консорциума

Как видно из данных, представленных на рисунке 2, синтез экзополисахаридов культурами комбинированной закваски начинается на ранних стадиях роста и продолжается в течение всего периода культивирования, максимальное количество экзополисахаридов отмечено в стационарной фазе роста и составляет $39,6 \text{ мкг/см}^3$.

При совместном культивировании культур *B. Bifidum* 8₃, *L. Cremoris* 24₄ и *P. Shermanii* AC-2503 на питательной среде с селенитом натрия отмечен сбалансированный рост микроорганизмов и количество жизнеспособных клеток через 20 ч культивирования составляет $(10^{10}-10^{11}) \text{ КОЕ/см}^3$.

Следует отметить, что экзополисахариды играют важную роль в формировании симбиотических систем. Так, данные, имеющиеся в литературе, свидетельствуют о том, что узнавание и первичные контакты симбионтов происходят благодаря взаимодействию полисахаридов клеточной поверхности бактерий, которые обеспечивают высокую адаптационную, физиологическую устойчивость клеток микроорганизмов.

Заключение

1. В результате проведенных исследований установлено, что подобранные условия культивирования консорциума пробиотических микроорганизмов обеспечивают высокую биохимическую активность и хорошие органолептические показатели инокулята.

2. Введение в состав питательной среды селенита натрия позволяет повысить синтез экзополисахаридов, усилить симбиотические взаимоотношения между пробиотическими бактериями и производственно-ценные свойства консорциума.

Библиография

1. Хамагаева И.С., Кузнецова О.С. Влияние селенита натрия на метаболизм и пробиотические микроорганизмы // Молочная промышленность. – 2010. – № 2. – С. 74.
2. Николаев Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 4. – С. 387–397.
3. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter sp.* // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 3. – С. 335–340.
4. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э. и др. Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.* в процессе периодического культивирования // Микробиология. – 1994. – Т. 63, вып. 6. – С. 1015–1019.

Bibliography

1. Khamagaeva I.S., Kuznetsova O.S. Effect of sodium selenite on the metabolism and probiotic microorganisms // Molochnaya promyshlennost. – 2010. – N 2. – P. 74.
2. Nikolaev Yu.A. Extracellular Factors of Bacterial Adaptation to Unfavorable Environmental Conditions // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2004. – Vol. 40, N 4. – P. 387–397.
3. Pirog T.P., Greenberg T.A., Malashenko Yu.R. Protective functions of exopolysaccharides synthesized by *Acinetobacter sp.* bacteria // Microbiology. – 1997. – Vol. 66, N 3. – P. 335–340.
4. Greenberg T.A., Pirog T.P., Pinchuk G.E. et al. Changes in the composition and properties of exopolysaccharides synthesized by *Acinetobacter sp.* during batch fermentation // Microbiology. – 1994. – Vol. 63, Issue 6. – P. 1015–1019.