

УДК 637.6

ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОПРОДУКТА «ЦЕЛЕБНЫЙ» ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Артюхова С.И.¹, Толстогузова Т.Т.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омский государственный технический университет», Омск, Россия (644050, Омск, Мира, 11), e-mail: asi08@yandex.ru

Перспективным направлением в области функционального питания является разработка биопродуктов на основе консорциумов пробиотических бактерий, которые обладают большей устойчивостью к неблагоприятным факторам среды и более высокой биохимической активностью по сравнению с заквасками, приготовленными с использованием чистых культур. Представлены результаты исследований биотехнологических свойств биопродукта «Целебный» для функционального питания. Установлено, что микрофлора биопродукта «Целебный» обладает широким спектром антимикробной активности по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам, устойчивостью к антибиотикам и веществам, присутствующим в желудочно-кишечном тракте человека. Установлено, что синтез экзополисахаридов более выражен у микробного консорциума по сравнению с исходными заквасками бактерий, входящими в его состав. Биопродукт «Целебный» обладает хорошими органолептическими показателями, содержит высокое количество жизнеспособных клеток пробиотических микроорганизмов и рекомендуется для восстановления нормальной микрофлоры кишечника человека.

Ключевые слова: биотехнологические свойства пробиотических микроорганизмов, антимикробная активность микрофлоры биопродукта, функциональные продукты.

STUDY OF BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF THE BIOPRODUCT "HEALING" FOR A FUNCTIONAL FOOD

Artyuhova S.I.¹, Tolstoguzova T.T.¹

¹Omsk State Technical University, Omsk, Russia (640050, Omsk, Mira prospekt, 11), e-mail: asi08@yandex.ru

Promising directions in the field of functional foods is the development of bio-based consortia of probiotic bacteria that are more resistant to adverse environmental factors and higher biochemical activity compared with cultures prepared using pure cultures. The article presents research into biotechnological properties of the bioproduct "Healing" used as a functional food. It has been established that the microflora of the bioproduct "Healing" has a broad spectrum of antimicrobial activity against pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms resistant to antibiotics and substances presented in the gastrointestinal tract of humans. It is established that the synthesis of exopolysaccharides is more pronounced in the microbial consortium in comparison with the original starter cultures of bacteria, included in its composition. The bioproduct "Healing" has good organoleptic characteristics and contains a high number of viable cells of probiotic microorganisms and is recommended for the restoration of normal human intestinal microflora.

Keywords: biotechnological properties of probiotic microorganisms, antimicrobial activity of microflora, functional products.

Одним из перспективных направлений в области функционального питания является разработка биопродуктов на основе консорциумов пробиотических бактерий, которые обладают большей устойчивостью к неблагоприятным факторам среды и более высокой биохимической активностью по сравнению с заквасками, приготовленными с использованием чистых культур [1, 2].

Целью исследований настоящей работы являлось изучение биотехнологических свойств биопродукта «Целебный» для функционального питания.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований являлись заквасочные культуры молочнокислых бактерий и бактериальных концентратов Барнаульской биофабрики, ЗАО "Вектор-БиАльгам", созданный микробный консорциум, полученные в ходе выполнения исследований, разработанные биопродукты после выработки и в процессе хранения. При выполнении экспериментальной части работы использовались современные приборы и методы, а также стандартные и общепринятые методы определения физико-химических, микробиологических и органолептических показателей. Антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам изучаемых заквасок молочнокислых бактерий и микробного консорциума, определяли методом последовательных разведений и развивающихся смешанных популяций в сравнении с ростом тест-культур в жидкой питательной среде, с последующим высевом на плотные среды. В качестве тест-микроорганизмов использовали: *E.coli*, *S.aureus*, *Pr.vulgaris*, *Ps.mirabilis*, *Kl.pneumoniae*, *Sh.flexneri*, *Sh.sonnei*, *S.cottbus*. Резистентность к антибиотикам микроорганизмов заквасок определяли по методу серийных разведений в жидкой питательной среде. Количество экзополисахаридов определяли антроновым методом. Математическую обработку экспериментальных данных по результатам 3-5 повторностей проводили по стандартным программам [1, 3, 5, 6, 7].

Результаты исследований и их обсуждение

Для исследований были выбраны отечественные закваски молочнокислых бактерий: L-1, L-2, L-4 и БК-Алтай-Снж, адаптированные для россиян, с высоким содержанием жизнеспособных клеток, не менее 10^9 КОЕ/см³, и доказанными позитивными эффектами, направленными на поддержание и восстановление здоровья (таблица 1).

Таблица 1

Биотехнологический потенциал заквасочных культур

Наименование заквасочных культур (ассоциатов)	Видовой состав микрофлоры ассоциатов	Оптим. температура развития, °С	Продолжительность сквашивания, ч	Количество клеток, КОЕ в 1 см ³
БК-Алтай-Снж	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> <i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	33±1	10±0,2	10 ¹¹
L-2	<i>Lactobacillus casei</i>	39±1	7±0,2	10 ⁹

L-1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	40±1	7±0,2	10 ⁹
L-4	<i>Lactobacillus delbrukii subsp. bulgaricus</i>	41±1	7±0,2	10 ⁹

Проведенные исследования показали, что выбранные заквасочные культуры имеют высокий биотехнологический потенциал. На основе этих заквасок был создан микробный консорциум, который использовался при производстве нового биопродукта «Целебный». При изучении биотехнологических биопродуктов, была изучена антагонистическая активность микрофлоры биопродуктов, приготовленных на исходных заквасках, а также с использованием созданного микробного консорциума путем подсчета lg количества клеток тест-культур в 1 см³ среды (рис. 1).

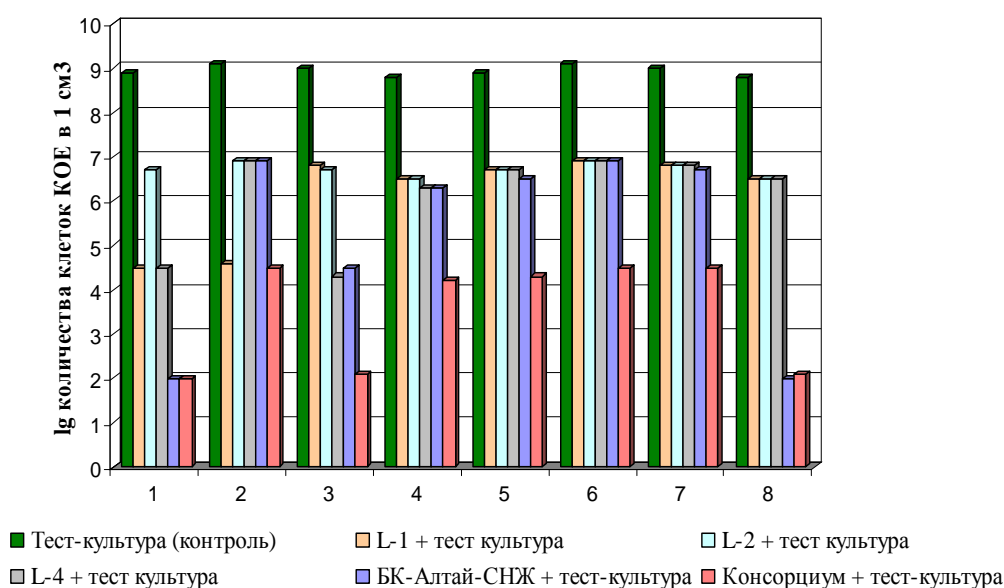


Рис.1. Антагонистическая активность биопродуктов ассоциатов и их консорциума по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

1 – *E.coli*, 2 – *S.aureus*, 3 – *Pr. vulgaris*, 4 – *Ps. mirabilis*,
5 – *Kl.pneumonia*, 6 – *Sh.flexneri*, 7 – *Sh.sonnei*, 8 – *S.cottbus*

Как показывают данные рисунка 1, антимикробная активность созданного консорциума по эффективности действия на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы значительно выше, чем у исходных заквасок. Высокая антагонистическая активность микробного консорциума, вероятно, обусловлена способностью бактерий выделять антимикробные субстанции.

Из литературных источников [1, 3, 4] известно, что *L.acidophilus* выделяют лактоцины В, F,G, М; *L.bulgaricus* – булгарицин; *Lactococcus lactis* – низин, *Streptococcus salivarius subsp.*

thermophilus синтезируют ацетоин; *Lactococcus cremoris* – диплоцин, *Lactobacillus casei* – бактериоцины, синтез которых усиливается при симбиотических взаимоотношениях.

Кроме того, в процессе метаболизма большинство используемых микроорганизмов продуцируют L-молочную кислоту и увеличивают антимикробную активность, т.к. по литературным данным L-молочная кислота и ее соли-лактаты натрия и кальция характеризуются достаточно высокой антимикробной активностью и способствуют увеличению сроков годности биопродуктов. Немаловажное значение при разработке нового биопродукта на основе микробного консорциума придается устойчивости микроорганизмов к антибиотикам – важному пробиотическому свойству микроорганизмов. При производстве молочных биопродуктов, обладающих лечебно-профилактическим действием, этому свойству придается большое значение.

Из литературных источников известно, что при лечении совместное применение антибиотиков и кисломолочных продуктов, заквашенных антибиотикоустойчивыми штаммами микроорганизмов, способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника уже в процессе антибиотикотерапии.

В связи с этим была изучена природная устойчивость микроорганизмов биопродуктов, приготовленных на исходных заквасках, так и с использованием микробного консорциума к ряду антибиотиков, которые применяются для лечения различных заболеваний. Это бициллин, кларбат, спарфлоксацин, гентамицин, левомецетин, фурадонин, тетрациклин, олететрин, сульфадиметоксин, 5-Нок. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Изучение резистентности биопродуктов на основе исходных заквасок и их консорциума микроорганизмов к антибиотикам

Наименование антибиотика	Ед. измерения активности антибиотика	Изучаемые дозы антибиотиков	Концентрация антибиотика, к которой устойчивы ассоциаты и их микробный консорциум				
			L-1	L-2	L-4	СНЖ	К
Бициллин	Ед/см ³	100;10; 1; 0,1; 0,01	1	1	1	0,1	10
Кларбат	Мкг/см ³	1000; 100; 10; 1; 0,1	100	100	10	100	1000
Спарфлоксацин	Мкг/см ³	1000; 100; 10; 1; 0,1	1000	1000	1000	1000	1000
Гентамицин	Мкг/см ³	80; 40; 8; 4; 0,8	80	40	40	8	80
Левомецетин	Мкг/см ³	2500; 250; 25; 2,5; 1,25	250	250	25	25	2500
Фурадонин	Мкг/см ³	1000; 100; 10; 1; 0,1	1000	100	1000	1000	1000
Тетрациклин	Мкг/см ³	1000; 100; 10; 1; 0,1	1000	100	1000	100	1000
Олететрин	Мкг/см ³	250; 25; 2,5; 0,25; 0,025	2,5	2,5	25	250	250
Сульфадиметоксин	Мкг/см ³	1000; 100; 10; 1; 0,1	1000	1000	1000	1000	1000
5-Нок	Мкг/см ³	50; 25; 2,5; 0,25; 0,025	25	2,5	25	0,25	50

При изучении резистентности биопродуктов на основе исходных заквасок и консорциума к выбранным антибиотикам было установлено, что резистентность микрофлоры биопродукта на основе микробного консорциума ко всем исследуемым антибиотикам значительно возросла, по сравнению с биопродуктами на основе исходных заквасок. Это повышение вероятно, обусловлено приобретением новой генетической информации, которую несут клетки микроорганизмов консорциума за счет передачи плазмид в процессах трансдукции и конъюгации не только близкородственным видам, но и родам бактерий.

Из литературных источников известно, что мезофильные лактококки содержат от 3 до 7 плазмид, которые кодируют такие свойства, как продуцирование антибиотических веществ и сохранение устойчивости к антибиотикам. При изменении температуры культивирования, вероятно, происходит перестройка геномов бактериальных внехромосомных молекул ДНК (плазмид), которые характеризуются большей степенью нестабильности по сравнению с хромосомной ДНК и поэтому изменяется резистентность к антибиотикам.

Была изучена устойчивость микроорганизмов биопродуктов на основе заквасок и их консорциума к 0,4% фенола, 2%, 4% и 6,5% NaCl, 20%, 30% и 40% желчи и к щелочной реакции среды при pH 7,5; 8,3; 9,2 и 9,6 и установлено, что консорциум более устойчив ко всем исследуемым факторам, что может подтвердить его высокие пробиотические свойства и лучшую способность клеток бактерий, входящих в его состав приживаться в желудочно-кишечном тракте человека.

Известно, что внутри бактериальной популяции комплексной закваски протекают сложные процессы, клетки бактерий находятся в постоянном взаимодействии. С целью выяснения роли физиологических взаимодействий (агрегации и когезии) клеток исходных заквасок в микробном консорциуме, были исследованы колонии микроорганизмов в исходных заквасках и их консорциуме (рис.2 и 3). В результате исследований установлено, что в биопродукте на основе микробного консорциума наблюдаются более близкие межклеточные контакты молочнокислых палочек и стрептококков, что свидетельствует о когезии клеток в микробном консорциуме.

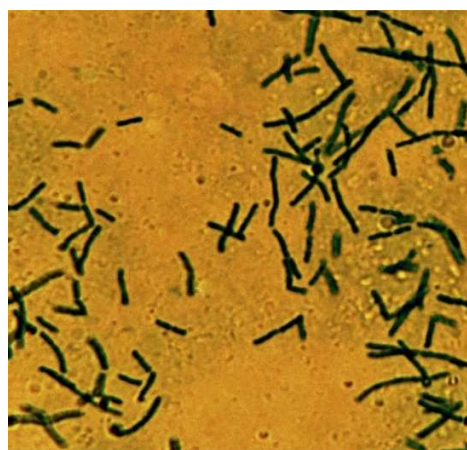
Агрегация колоний микроорганизмов заквасок, входящих в микробный консорциум, демонстрирует их способность к многоклеточной организации, к прочным симбиотическим отношениям, к образованию единого полимерного матрикса, что характерно для бактерий в их естественных местах обитания, например, в желудочно-кишечном тракте человека.

Известно, что экзополисахариды (ЭПС), синтезируемые молочнокислыми бактериями, не только улучшают реологические свойства биопродуктов, но и способствуют адгезии

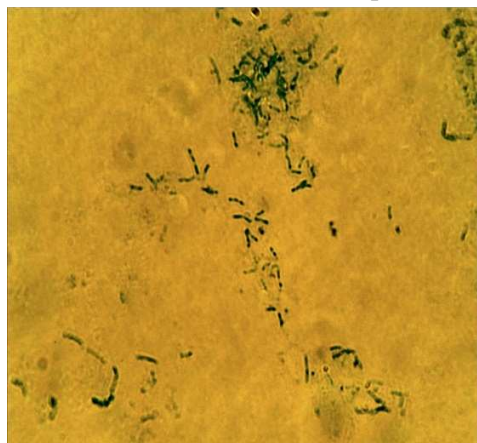
полезных микроорганизмов на стенки кишечника. Из литературных источников известно, что экзополисахариды выполняют функции саморегуляторов процессов роста и размножения микроорганизмов. ЭПС защищают клетки от фагов, препятствуют высушиванию клеток, повреждениям при заморозке и денатурации белка, а некоторые экзополисахариды используются их продуцентами и в качестве источника углерода. Следует отметить, что ЭПС служат также барьером между клетками и окружающей средой, выполняя защитную роль против высушивания и замораживания, а также обеспечивают адаптацию в других экстремальных условиях. Именно эти свойства во многом и позволяют создавать глубоководные, а также лиофилизированные закваски и биопродукты, с высокой биохимической активностью.



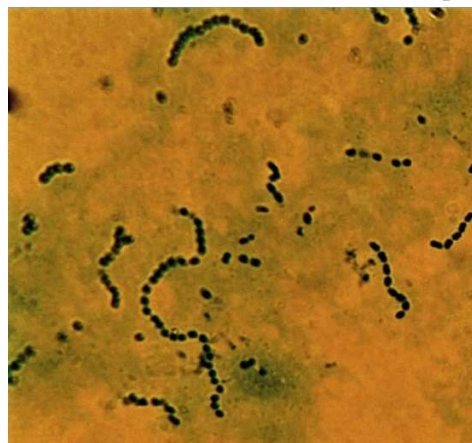
L-1 (*Lactobacillus acidophilus*)



L-4 (*Lactobacillus delbrukii* subsp. *bulgaricus*)

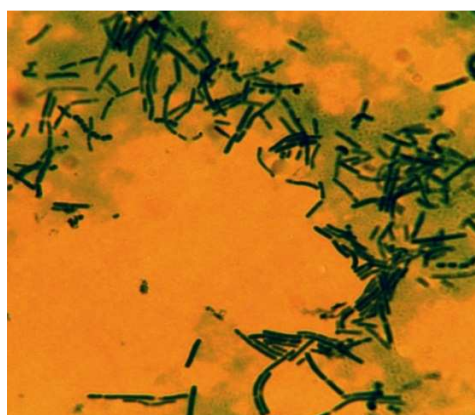


L-2 (*Lactobacillus casei*)



БК-Алтай-СНЖ (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis*
subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus salivarius thermophilus*)

Рис.2. Микроскопическая картина микрофлоры заквасок L-1, L-2, L-4, БК-Алтай-Снж (ув. x 1000)



Микробный консорциум (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrukii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus salivarius thermophilus*)

Рис. 3. Микроскопическая картина микрофлоры консорциума (ув. x 1000)

Более того, экзополисахариды, продуцируемые микроорганизмами, интенсифицируют процесс ферментации молока, сокращая время образования сгустка, а также стимулируют рост самих бактерий и синтез ими других полезных метаболитов (аминокислот, летучих жирных кислот, витаминов) [1, 4, 8]. Поэтому был изучен биосинтез экзополисахаридов биопродуктов на основе заквасок и их консорциума. Результаты исследований представлены в табл.3.

Таблица 3

Содержание экзополисахаридов в биопродуктах на основе заквасок и их микробном консорциуме

N п/п	Исследуемые закваски и их микробный консорциум	Состав исходных заквасок и их микробного консорциума	Количество ЭПС из 100 г образца, г
1.	L-1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,0337±0,0012
2.	L-2	<i>Lactobacillus casei</i>	0,0341±0,0011
3.	L-4	<i>Lactobacillus delbrukii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,0337±0,0011
4.	БК-Алтай-Снж	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	0,0325±0,0011
5.	Микробный консорциум	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrukii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	0,0375±0,0012

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что микроорганизмы все заквасок синтезируют экзополисахариды. Наибольшее количество экзополисахаридов среди

исходных заквасок синтезируется в образцах с лактобациллами, наименьшее – с лактококками, среди лактобацилл наибольшее накопление ЭПС обнаружено в образце, приготовленном с использованием *Lactobacillus casei*. Важно отметить, что синтез экзополисахаридов более выражен у микробного консорциума по сравнению с исходными заквасками бактерий, входящими в его состав.

Заключение

Результаты исследований показали, что микрофлора биопродукта на основе микробного консорциума обладает широким спектром антагонистической активности по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам. Установлено, что антагонистическая активность микробного консорциума по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям, а также устойчивость к антибиотикам, желчи, фенолу, повышенным концентрациям хлористого натрия, изменениям рН среды, биосинтез экзополисахаридов микробного консорциума более выражены по сравнению с заквасками, входящих в его состав. Биопродукт «Целебный» обладает хорошими органолептическими показателями, содержит 10^{10} КОЕ/см³ клеток пробиотических микроорганизмов и рекомендуется для восстановления нормальной микрофлоры кишечника человека.

Список литературы

1. Артюхова С.И. Научно-экспериментальное обоснование новых биотехнологий синбиотических молочных продуктов: дис... д-ра техн. наук./Артюхова Светлана Ивановна. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 313 с.
2. Банникова Л.А. Микробиологические основы молочного производства / Л.А. Банникова, И.С. Королева, В.Ф. Семенихина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
3. Ботина С.Г. Использование штаммов молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды, в производстве кисломолочных продуктов питания/С.Г. Ботина, И.В. Рожкова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – № 1. – С. 38–40.
4. Ганбаров Х.Б. Антибактериальная активность лактобактерий рода *Lactobacillus* / Х.Б. Ганбаров, М.М. Джафаров // Молочная промышленность. – 2006. – № 8. – С. 56.
5. Иркитова А.Н. Идентификация и количественный учет микроорганизмов в бактериальных заквасках и концентратах // Молочная промышленность. – 2013. – №11. – С.36–38.
6. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов/ П.П. Степаненко. – М. – 2003. – 413 с.

7. Артюхова С.И. Пробиотический биопродукт для корпоративного питания [Текст] / С.И. Артюхова, Т.Т. Толстогузова // Молочная промышленность. – 2014. – № 9. – С.60-61.
8. Хамагаева И.С. Исследование экзополисахаридов микробных ассоциатов и их консорциумов /И.С. Хамагаева, С.И. Артюхова //Материалы международного конгресса “Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты”. Клиническое питание. Санкт-Петербург, 15–16 мая 2007 года. – СПб. – 2007. – 72 с.

Рецензенты:

Решетник Е.И., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Технологии переработки продукции животноводства» ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет», г. Благовещенск;

Беспалова Т.А., д.в.н., профессор кафедры «Экологии и естественнонаучных дисциплин» АНО ВПО «Омский экономический институт», г. Омск.