

**И.В. Бояринева**, докторант  
**Н.Ю. Потапчук**, аспирант  
**И.С. Хамагаева**, д-р техн. наук, проф.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления

УДК 637.146.21:579.872

## **РАЗРАБОТКА МУЛЬТИШТАММОВОЙ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ЗАКВАСКИ**

*В статье представлены результаты исследований по подбору культур кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий с целью создания консорциума микроорганизмов. Дана качественная характеристика комбинированной закваски.*

**Ключевые слова:** пробиотики, пробиотические продукты, закваска, антагонизм, симбиоз.

**I.V. Boyarineva**, Cand. Sc. Engineering

**N.Yu. Potapchuk**, P.G.

**I.S. Khamagaeva**, D. Sc. Engineering, Prof.

East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude

## **DEVELOPMENT OF MULTISTRAIN PROBIOTIC STARTER**

*The paper presents technological aspects of making a combined starter-based kefir grains and propionic acid bacteria for its further use in the production of probiotic fermented milk products.*

**Key words:** probiotics, probiotic products, starter, antagonism, symbiosis.

### **Введение**

В современных условиях в связи с ухудшением экологической обстановки и широким применением антибиотиков наблюдается ухудшение здоровья населения.

В настоящее время проблема изучения микробной экологии человека выдвигается в разряд наиболее актуальных и перспективных. Разработка и массовое использование пробиотиков и пробиотических продуктов являются микрoэкологическим базовым приемом поддержания физического и духовного здоровья населения, увеличения продолжительности и активности жизни пожилых людей и важнейшей предпосылкой появления нового здорового поколения.

В связи с этим перед молочной промышленностью стоит перспективная научно-техническая проблема – совершенствование и выход на новый качественный уровень по производству и использованию микроорганизмов-пробиотиков.

В этом отношении заслуживают внимания микробные консорциумы, ярким представителем которых являются кефирные грибки. Являясь комбинацией разных микроорганизмов, микробные консорциумы менее чувствительны к воздействию фагов, ингибиторов роста и других вредных для микроорганизмов факторов. Отмечается, что для биоинженерии и индустриальной биотехнологии микробные консорциумы становятся той «горячей точкой» роста, которая будет со временем определять темпы их дальнейшего развития [1].

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают пропионовокислые бактерии, обладающие высокими пробиотическими свойствами. Положительная роль пропионовокислых бактерий обусловлена образованием ими пропионовой кислоты, минорных органических кислот, ферментов и большого количества витамина B<sub>12</sub> [2].

Сочетание микрофлоры кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий позволит повысить пробиотические свойства продуктов. По мнению многих исследователей, многоштаммовые закваски устойчивы к неблагоприятным факторам среды и обладают более высокой активностью в сравнении с заквасками, приготовленными на отдельных культурах.

**Целью** настоящего исследования является создание консорциума микроорганизмов с новыми биотехнологическими свойствами.

### Объекты и методы исследований

Объектами исследований служили штаммы пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* KM 186, *Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii* AC-2500, *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* AC-2503, полученные из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов (Москва), активизированные биотехнологическим способом, разработанным в Восточно-Сибирском государственном технологическом университете (ныне Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления). Культивирование пропионовокислых бактерий осуществляли на сывроточной среде с добавлением ростовых факторов [2].

Антимутагенную активность определяли по тесту Эймса [3], содержание витамина В<sub>12</sub> – спектрофотометрическим методом [4].

### Результаты и их обсуждение

Многочисленными исследованиями доказано, что при подборе заквасок для кисломолочных продуктов очень важно, чтобы входящие в состав микроорганизмы находились в прочных симбиотических взаимоотношениях. Поэтому первостепенной задачей при составлении заквасок является выявление взаимоотношений между микроорганизмами. Известно, что молочнокислые бактерии находятся в антагонистических и симбиотических взаимоотношениях. При антагонизме наблюдается угнетение роста, т.е. культуры–антагонисты не способны сочетаться с культурами другого вида, а симбиотический характер взаимоотношений ведет к взаимному усилению роста.

С учетом вышесказанного исследуемые культуры были проверены на антагонизм по методике Романович.

Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Исследование взаимоотношений между микроорганизмами

Вид микроорганизма	Фильтрат чистой культуры
<i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i> KM 186	Реакция отрицательная
<i>Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii</i> AC-2500	Реакция отрицательная
<i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i> AC-2503	Реакция отрицательная
Кефирная грибковая закваска	Реакция отрицательная

Следует отметить, что изменение окраски метиленовой сини в присутствии пропионовокислых бактерий, а также в сочетании пропионовокислых бактерий с кефирной грибковой закваской не происходило в течение 2–3 ч. А через 4–4,5 ч начиналось постепенное обесцвечивание метиленовой сини одновременно с контролем (без пропионовокислых бактерий). Полное обесцвечивание наступало через 8–10 ч, что свидетельствует об отсутствии явления антагонизма. Следовательно, исследуемые культуры могут быть рекомендованы для составления комбинированной закваски.

Для более детального выяснения характера взаимоотношений между микроорганизмами исследовали влияние пропионовокислых бактерий на развитие микрофлоры кефирной закваски. Результаты представлены в таблице 2 (для исследований был взят штамм *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* KM 186).

Анализ данных, представленных в таблице 2, показывает, что пропионовокислые бактерии стимулируют рост микроорганизмов кефирной грибковой закваски. В процессе роста пропионовокислые бактерии обогащают среду рядом продуктов своего метаболизма, особенно витаминами группы В. Микроорганизмы кефирной грибковой закваски используют для своего развития данные факторы роста.

Таблица 2

Исследование влияния фильтратов культуральной жидкости  
на рост пропионовокислых бактерий

Фильтраты культуральной жидкости	Рост <i>Pr. Shermanii</i> в разведениях		
	1:4	1:8	1:16
Кефирная грибковая закваска	+++	++++	++++
<i>Pr. shermanii</i> КМ186 и кефирная грибковая закваска 1:1	+++	++++	++++
<i>Pr. shermanii</i> КМ 186 и кефирная грибковая закваска 1:0,8	++++	++++	++++
<i>Pr. shermanii</i> КМ 186 и кефирная грибковая закваска 1:0,5	+++	++++	++++

++++ – стимуляция роста

+++ – нормальный рост

Отмечен активный рост пропионовокислых бактерий в консорциуме микроорганизмов кефирной грибковой закваски при утилизации лактата, образуемого молочнокислой микрофлорой, что свидетельствует о симбиотических взаимоотношениях микроорганизмов.

Таким образом, приведенные выше результаты свидетельствуют о сочетаемости пропионовокислых бактерий с микрофлорой кефирной грибковой закваски.

Для получения закваски с хорошими биотехнологическими свойствами необходимо подобрать оптимальное соотношение заквасочных культур.

Для выбора соотношения культур составляли различные варианты заквасок и изучали их свойства. В качестве контроля была взята кефирная грибковая закваска. При составлении комбинированной закваски прежде всего учитывали количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий, количество продуцируемого ими витамина В<sub>12</sub>, продолжительность образования сгустка и органолептические свойства. Полученные результаты представлены в таблице 3.

В результате проведенных исследований установлено, что уменьшение содержания клеток пропионовокислых бактерий приводит к резкому снижению содержания витамина В<sub>12</sub> в заквасках.

Результаты исследований показали, что динамика кислотообразования во всех образцах достаточно равномерная. В закваске с соотношением культур 1:1 сгусток формируется быстрее, чем в других образцах.

Из анализа данных таблицы 3 видно, что уменьшение дозы пропионовокислых бактерий в закваске приводит к снижению содержания витамина В<sub>12</sub>, летучих жирных кислот и СО<sub>2</sub>. При этом количество клеток пропионовокислых бактерий в конце ферментации достигает 10<sup>9</sup> к.о.е. в см<sup>3</sup>, что свидетельствует об активном росте пропионовокислых бактерий в консорциуме микроорганизмов. В результате проведенных исследований выбрано оптимальное соотношение кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий 1:1. Данное соотношение комбинированной закваски характеризуется наиболее высоким содержанием жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий – 5·10<sup>9</sup> и витамина В<sub>12</sub> – 536,3 мкг/мл, а также хорошими органолептическими свойствами.

Результаты проведенных исследований показали возможность совместного культивирования кефирной грибковой закваски и пропионовокислых бактерий.

В дальнейших исследованиях были изучены антимуtagenные свойства комбинированной закваски.

Рост и метаболическая активность бактерий служат фундаментальными факторами для получения биомассы и промышленно ценных продуктов. К этим факторам следует добавить еще одно важное свойство бактерий – биосинтез соединений, обладающих антимуtagenным и антиканцерогенным действием.

Выбор оптимального соотношения культур в комбинированной закваске

Показатель	Характеристика комбинированной закваски при различном соотношении культур (кефирные грибки : пропионовокислые бактерии)			
	Варианты комбинированной закваски			
	1:1	1:0,8	1:0,5	Контроль
Консистенция и внешний вид	Однородная, нежная, сметанообразная	Однородная, в меру вязкая	Жидкая, однородная	Однородная, с нарушенным сгустком
Вкус и запах	Кисломолочный, освежающий	Вкус и запах чистые, кисломолочные	Выраженный кисломолочный, излишне «кефирный», слегка острый	Кисломолочный, освежающий
Цвет	Молочно-белый			
Продолжительность сквашивания, ч	5,5-6,0	6,5-7,0	7,0-7,5	10-12
Титруемая кислотность, °Т	72	74	74	85
pH	4,83	4,75	4,75	4,35
Количество витамина B <sub>12</sub> , мкг/мл	536,3	467,5	196,3	0,75
Летучие жирные кислоты, мл 0,1 н NaOH	1,0	0,8	0,6	0,5
Наличие диацетила	+	+	+	+
Наличие ацетоина	+	+	+	+
Наличие CO <sub>2</sub> , мм	10	8	6	5
Количество жизнеспособных клеток <i>Pr. Shermanii</i> , к.о.е./см <sup>3</sup>	5x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>9</sup>	-

Под антимуtagenезом понимают снижение частоты спонтанной и индуцированной мутации. Антимутагены регулируют скорость спонтанных мутаций, стабилизируют мутационный процесс.

В целом проблема антимуtagenеза и антимутагенных свойств бактерий имеет большое будущее, ибо включает в себя как вопросы здоровья людей, так и фундаментальные вопросы биологии.

Изучение антимуtagenеза важно именно в отношении тех бактерий, которые используют при изготовлении кормовых добавок и пищи. Бактерии-пробиотики как источники биоантимутагенов или дисмутагенов могут быть использованы для предобработки пищевых продуктов и кормов с целью нейтрализации мутагенных (канцерогенных) веществ.

Пропионовокислые бактерии известны выраженным антимутагенным действием. Поскольку в естественных условиях микроорганизмы постоянно подвергаются действию мутагенов, у них сформировались эндогенный и экзогенный защитные механизмы: у всех живых существ образуются молекулы, способные к осуществлению антимуtagenеза. Антимутагены пропионовокислых бактерий повышают активность ферментных систем, участвующих в детоксикации поступающих в клетку веществ, оказывая влияние на окислительно-восстановительный потенциал организма – эти процессы приводят к снижению мутаций. Однако антимуtagenез кефирных грибов до сих пор не изучен. В связи с этим была исследована антимутагенная активность комбинированной закваски. Результаты исследований представлены в таблице 4.

## Определение антимуtagenной активности комбинированной закваски

Вид микроорганизмов	Среднее число ревертантов на чашку	Ингибирование, %
Кефирная грибковая закваска	885	30,0
Пропионовокислые бактерии <i>Pr. Shermanii</i> KM 186	502	47,2
Комбинированная закваска	532	57,8

В результате экспериментальных исследований установлено, что кефирная грибковая закваска обладает достаточно высокой антимуtagenной активностью в отношении мутагена-за, индуцируемого 4-нитрохинолин-N-оксидом. Следует отметить, что степень ингибирования на 17% ниже, чем у пропионовокислых бактерий. Наиболее сильное ингибирующее действие обнаружено у комбинированной закваски. Вероятно, более высокая антимуtagenная активность комбинированной закваски объясняется тем, что микроорганизмы закваски синтезируют значительные количества антиокислительных ферментов: супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы. Одновременное присутствие этих ферментов позволяет клетке удалять супероксидные и пероксидные радикалы, образованные в окислительных реакциях.

Таким образом, установлено, что кефирная грибковая закваска обладает выраженной антимуtagenной активностью. Кроме того, введение пропионовокислых бактерий в консорциум микроорганизмов кефирной грибковой закваски повышает антимуtagenные свойства комбинированной закваски.

#### Выводы

1. Установлено, что при совместном культивировании пропионовокислых бактерий с кефирной грибковой закваской отсутствуют явления антагонизма.
2. Подобрано оптимальное соотношение культур пропионовокислых бактерий и кефирной грибковой закваски, обеспечивающее высокий синтез биологически активных веществ и количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий.
3. Выявлено, что комбинированная закваска обладает выраженными антимуtagenными свойствами.

#### Библиография

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. – М.: Грант, 2001. – Т. 3. – 287 с.
2. Хамагаева И.С. [и др.]. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий. – Улан-Удэ, 2006. – 172 с.
3. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии. – М., 1999. – 300 с.
4. Канопкайте С. Кобаламины. – Вильнюс: Мокслас, 1978. – 144 с.

#### Bibliography

1. Shenderov B.A. Medical microbial ecology and functional food. – M.: Grant, 2001 – Vol. 3. – 287 p.
2. Khamagaeva I.S. [et al.]. Propionic acid bacteria ferments biotechnology. – Ulan-Ude, 2006. – 172 p.
3. Vorobyova L.I. Propionic acid bacteria. – M., 1999. – 300 p.
4. Kanopkajte S. Cobalamin. – Vilnius: Mokslas, 1978. – 144 p.