

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ ОТБОРА И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, пробиотики, функциональные продукты.

Изучена устойчивость штаммов молочнокислых бактерий к неблагоприятным факторам внешней среды, воспроизводящим in vitro некоторые условия желудочно-кишечного тракта человека. Выявлены перспективные штаммы для применения их в качестве пробиотиков в производстве функциональных продуктов питания.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics and functional foods.

Stability of lactic acid bacteria to adverse environmental factors, reproducing in vitro some of the conditions of the gastrointestinal tract of humans. Identifying promising strains for their use as probiotics in the production of functional foods.

Введение

В последнее десятилетие значительно расширился рынок ферментированных пищевых продуктов, в технологии приготовления которых молочнокислые бактерии выполняют принципиально важные функции, определяющие характерные особенности и качество конечного продукта.

В пищевой промышленности наметилась тенденция применять стартовые культуры с комплексом стабильных свойств, обеспечивающих целенаправленное протекание процесса выработки ферментированных пищевых продуктов, в том числе со сложным сырьевым составом [1-3].

Проводя направленный отбор микроорганизмов можно получить штаммы бактерий, обладающих специальным комплексом биотехнологических свойств, что позволяет проектировать и создавать новые продукты с направленным составом микрофлоры.

Ценными считаются штаммы, длительно сохраняющие биохимическую активность, зависящую и от внешних факторов (состава питательной среды, температуры и т.д.) и от соотношения между биохимически активными и неактивными клетками в популяциях микроорганизмов, что определяет жизнеспособность культуры, ее практическую ценность. Однако, функциональные свойства продуктов питания, ферментируемых лактобактериями, во многом зависят от свойств конкретных штаммов и их количеств в готовом продукте.

Микроорганизмы-пробионты осуществляют синтез разнообразных биологически активных соединений - медиаторов, участвующих в восстановлении и поддержании здоровья человека: витаминов, аминокислот, ферментов; участвуют в общем метаболизме; ускоряют процессы переваривания пищи и усвоения питательных веществ и др. [4,5].

При подборе функционально-активных штаммов молочнокислых микроорганизмов необходимо учитывать такие их свойства, как энергия кислотообразования, синтез протеолитических ферментов, резистентность к высоким концентрациям соли, желчи, различным значениям pH, антибиотикам и антагонистическая активность по отношению к патогенной и условно патогенной микрофлоре.

Несмотря на имеющиеся достижения в этой области актуальным является поиск отечественных конкурентоспособных стартовых культур молочнокислых бактерий для пищевой промышленности и разработка объективных критериев оценки их пробиотических свойств, что создает возможность для технологического использования этих микроорганизмов в производстве функциональных продуктов питания.

В медицинской практике сформирован ряд критериев, которым должны соответствовать микроорганизмы, включенные в группу пробиотиков. Основными из них специалисты считают следующие: микроорганизмы не должны иметь признаков патогенности и токсигенности; выживать при пассивировании через желудочно-кишечный тракт, что предполагает их резистентность к кислоте и желчи; обладать способностью к адгезии на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией; быть метаболически активными в экосистеме кишечника и оказывать терапевтическое действие; быстро размножаться, колонизируя кишечный тракт; сохранять физиологическую и биохимическую активность, как в пищевых продуктах, так и в процессе получения лиофилизированных препаратов [6,7].

Многие отмеченные положения, сформулированные в части требований к пробиотическим препаратам, входят в практику работы специалистов пищевого производства при создании ими пробиотических продуктов. Однако в целом идентификация бактерий в пищевой промышленности традиционно проводится на основе морфологических, физиологических, биохимических и технологических свойств. Основные изучаемые признаки при этом следующие: окраска по Граму; определение оптимальных и предельных температур роста и pH среды; рост в гидролизованном молоке, содержащем NaCl, желчь; активность кислотообразования; образование CO₂, аммиака из аргинина; отношение к лакмусовому молоку; сбраживание углеводов и спиртов.

В целях идентификации микроорганизмов могут применяться серологические методы и методы фаготипирования. Имеется практика внедрения

молекулярно-генетических характеристик при идентификации молочнокислых культур [8].

Следует отметить, что требования, предъявляемые к идентификации микрофлоры в пищевой промышленности не соответствуют требованиям сегодняшнего дня. Полностью отнести продукты массового потребления к продуктам пробиотической направленности можно только расширив комплекс идентификационных характеристик специфической функциональной микрофлоры пищевых продуктов.

Для обеспечения функциональных свойств минимальный уровень жизнеспособных клеток в продукте должен составлять не менее 10^6 КОЕ/см³ в течение всего срока годности [9,10]. В настоящее время имеется тенденция к увеличению нормы содержания жизнеспособных клеток пробиотических культур в продукте, в некоторых странах Западной Европы минимальный уровень клеток повышен до 10^7 КОЕ/см³ [8].

Однако исследования показывают, что значительная часть пробиотических клеток теряет свою активность вследствие гибели микроорганизмов при хранении продукта, а также в процессе прохождения через желудочно-кишечный тракт. Причиной этому является низкое значение pH у кисломолочных продуктов, влияние соляной кислоты, желчи, фенола и пепсина желудочного сока [5,7,11-14].

В процессе брожения в кишечнике образуются индол, скатол, фенол, которые угнетают рост и развитие полезной микрофлоры. Установлено, что лишь устойчивые к фенолу (0,4-0,5 %) формы лактобактерий способны приживаться в желудочно-кишечном тракте [8,15]. Желчь поступает в дуоденальный отдел тонкого кишечника, обуславливает отмирание большого количества бактерий, так как клеточные мембраны, состоящие из липидов и жирных кислот, очень чувствительны к разрушению солями желчных кислот. В связи с этим эффективность пробиотических микроорганизмов зависит от устойчивости их к желчи (способность расти в присутствии до 40 % солей желчи) [13,15].

Таким образом, оценка толерантности молочнокислых бактерий к желчи, фенолу и низким значениям pH являются основными критериями для отбора производственно-ценных штаммов с пробиотическими свойствами.

Целью настоящей работы было выделение, идентификация и изучение устойчивости штаммов молочнокислых бактерий к неблагоприятным факторам внешней среды, воспроизводящим *in vitro* некоторые условия желудочно-кишечного тракта человека.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили культуры молочнокислых бактерий *p. Lactobacterium: Lmb. casei, Lmb. plantarum, Lmb. bavaricus, Lbm. acidophilum, Lmb. fermentum* и *Lmb. brevis*, выделенные из природных источников (квашеной капусты, кислого коровьего молока, ржаной муки), микрофлора которых сформирована естественным путем. В качестве контрольных штаммов использовали культуры, предоставленные ГУ НИИ питания РАМН (г. Москва).

Метод выделения чистых культур заключался в высеве определенного количества продукта и его

разведений на агаризованные селективные питательные среды МРС и Рогоза. Отдельные колонии использовали для получения чистой культуры и дальнейшего их исследования.

Идентификацию выделенных штаммов микроорганизмов осуществляли по морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим признакам. Основные изучаемые характеристики при этом: окраска по Граму; определение оптимальных и предельных температур роста и pH среды; рост в присутствии NaCl, желчи; образование CO₂; сбраживание углеводов и спиртов.

Кислотообразование штаммов оценивали по активной и титруемой кислотности при культивировании в стерильном обезжиренном молоке. Определение титруемой кислотности проводили по ГОСТ 3624-92. Активную кислотность (pH) определяли потенциометрически при помощи электронного pH-метра по ГОСТ 3224-84. Активность свертывания молока определяли по продолжительности образования сгустка.

Определение устойчивости к желчи. Культивирование проводили на жидкой питательной среде, содержащей 0,5, 20 и 40 % желчи в течение 24 ч. В экспериментах использовали препарат желчи медицинской (*Chole medicata*), содержащий натуральную пузырную желчь крупного рогатого скота. Процент выживаемости оценивали по количеству жизнеспособных клеток бактерий в 1 см³ суспензии (число КОЕ).

Определение устойчивости к поваренной соли. Способность бактерий расти в присутствии NaCl исследовали на жидкой питательной среде с добавлением соли в концентрации от 2 до 6,5 %. Устойчивость к соли определяли по уровню накопления биомассы (изменения оптической плотности) и числу КОЕ через 24 ч культивирования при оптимальной температуре.

Определение устойчивости к фенолу. Устойчивость штаммов молочнокислых бактерий к фенолу определяли по уровню накопления биомассы (изменению оптической плотности) и числа КОЕ после 24 ч культивирования посевов при оптимальной температуре в жидкой питательной среде с концентрацией фенола 0,4 %.

Результаты исследований и обсуждение

В ходе работы был выделен ряд молочнокислых микроорганизмов различных таксонов. Для дальнейших исследований по совокупности изученных свойств было отобрано 9 «диких» штаммов (Д) и - 6 производственных штаммов (Пр), принадлежащих к различным видам рода *Lactobacterium: L. casei, L. plantarum, L. bavaricus, L. fermentum* и *L. brevis*.

Результаты экспериментальных исследований показали, что характер накопления биомассы у исследуемых штаммов варьирует на уровне как вида, так и штамма молочнокислых бактерий. Следует отметить, что все штаммы в течение первых 10-12 ч активно накапливают биомассу.

Все изучаемые культуры хорошо ферментируют молоко (табл. 1), штаммы, относящиеся к *Lmb. casei*, *Lmb. plantarum* и штаммы *Lbm. acidophilum* (Пр) и *Lmb. bavaricus* (Д) образуют плотные сгустки однородной консистенции. Вкус сгустка чистый кисло-молочный. Штаммы *Lmb. fermentum* и *Lmb. brevis* (Д) образуют неплотные сгустки с отделением сыворотки.

Таблица 1 – Кислотообразующая активность штаммов молочнокислых бактерий

Штамм	Активность ферментации, час	Кислотность			Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см ³
		Активная, pH	Титруемая, °Т	Пределная, °Т	
<i>Lmb. casei</i> 1 (Пр)	6	4,64	106	154	$2,2 \cdot 10^{10}$
<i>Lmb. casei</i> 2 (Пр)	6	4,63	108	158	$1,8 \cdot 10^{10}$
<i>Lmb. casei</i> 3 (Д)	7	4,70	108	154	$1,0 \cdot 10^{10}$
<i>Lmb. casei</i> 4 (Д)	6	4,68	110	158	$5,3 \cdot 10^9$
<i>Lmb. casei</i> 5 (Д)	4	4,59	120	170	$3,0 \cdot 10^{10}$
<i>Lmb. casei</i> 6 (Д)	6	4,71	110	156	$1,8 \cdot 10^{10}$
<i>Lmb. fermentum</i> 1(Пр)	7	4,70	104	142	$5,4 \cdot 10^9$
<i>Lmb. fermentum</i> 2(Пр)	8	4,76	106	148	$9,5 \cdot 10^9$
<i>Lmb. fermentum</i> 3(Д)	6	4,75	100	138	$3,6 \cdot 10^9$
<i>Lmb. fermentum</i> 4(Д)	7	4,77	112	154	$2,4 \cdot 10^{10}$
<i>Lmb. plantarum</i> 1(Пр)	6	4,71	104	176	$7,7 \cdot 10^9$
<i>Lmb. plantarum</i> 2 (Д)	6	4,70	102	178	$1,5 \cdot 10^9$
<i>Lbm. acidophilum</i> (Пр)	4	4,62	119	210	$2,1 \cdot 10^9$
<i>Lmb. bavaricus</i> (Д)	6	4,67	112	174	$1,9 \cdot 10^{10}$
<i>Lmb. brevis</i> (Д)	14	5,00	76	122	$4,9 \cdot 10^8$

Следует отметить, что технологические показатели «диких» штаммов молочнокислых бактерий мало отличались от производственных штаммов, а некоторые даже превосходили их по энергии кислотообразования. Наиболее перспективные из них: *Lmb. casei* 5 (Д) и *Lmb. fermentum* 4 (Д) и *Lmb. plantarum* 2 (Д) и *Lmb. bavaricus* (Д). Технологические показатели штамма *Lmb. brevis* (Д) не удовлетворительны, но возможно использовать данный штамм в консорциуме с другими штаммами молочнокислых бактерий.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что по технологическим показателям все исследуемые штаммы, кроме *Lmb. brevis* (Д), подходят для производственных целей, о чем свидетельствует быстрая ферментация молока и максимальное количество жизнеспособных клеток (10^9 - 10^{10} КОЕ/см³), а также уровень титруемой кислотности 100-120 °Т после 24 ч культивирования, что соответствует технологическим требованиям для производства многих видов кисло-молочной продукции.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что все исследуемые штаммы образуют прозрачные ореолы пептизации казеина на молочном агаре по Эйкману, что свидетельствует о способности штаммов образовывать протеолитические ферменты, гидролизующие молочный белок. Эти данные под-

тверждают возможность их использования в пищевой промышленности. К тому же продукция внеклеточных и клеточносвязанных протеиназ обуславливает лечебно-профилактические свойства культур, играющих существенную роль в нормализации белкового обмена в организме [5].

В ходе работы получены данные о выживаемости исследуемых лактобактерий при стрессовых значениях pH (рис.1) и в присутствии 20 и 40 % желчи (рис.2), являющихся максимальными концентрациями, с которыми встречаются клетки бактерий в кишечнике.

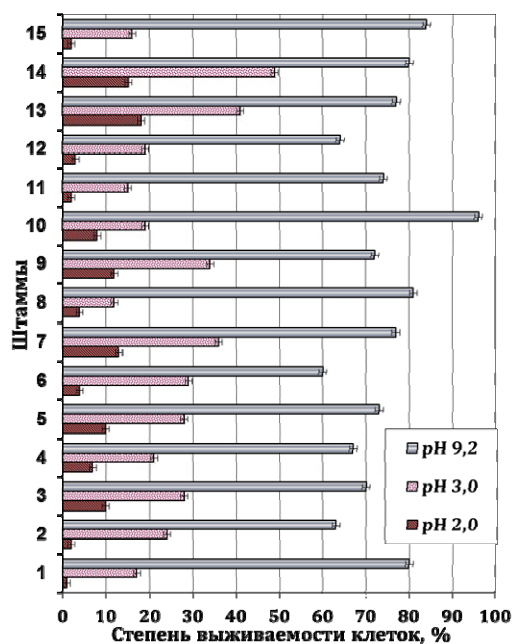


Рис. 1 - Изменение степени выживаемости лактобактерий при различных значениях pH

Выявлено, что значение pH 2,0 является ингибирующим для большинства штаммов, процент выживаемости колеблется в пределах 0,5-10 % для штаммов *Lmb. casei* и *Lmb. plantarum*, 4-12 % - для *Lmb. fermentum*. Наибольшую кислотоустойчивость проявляют штаммы *Lbm. acidophilum*, *Lmb. bavaricus* – 18 и 15 % соответственно.

Увеличение pH до 9,2 не является существенным стрессовым фактором для тестируемых штаммов молочнокислых бактерий, так как культуры в этих условиях имеют хороший процент выживаемости 62-96 % в зависимости от штамма, наибольшую устойчивость к щелочной среде проявляют штаммы *Lmb. fermentum* 4(Д) – 96 % и *Lmb. brevis* (Д) – 84 %.

Результаты экспериментальных исследований показали, что степень резистентности молочнокислых бактерий к различным значениям pH варьируется в зависимости как от вида, так и от штамма. Удалось выделить четыре «диких» штамма молочнокислых бактерий, два из которых *Lmb. bavaricus* (Д), *Lmb. fermentum* 3(Д) наиболее устойчивы к низким значениям pH, а штаммы *Lmb. fermentum* 4(Д) и *Lmb. brevis* (Д) - толерантны к сильнощелочным реакциям среды, что является предпосылкой воз-

возможного использования этих штаммов в составе пробиотиков.

Выявлено, что при концентрации желчи 0,5 % наблюдается стимуляция роста у всех штаммов молочнокислых бактерий, возможно, это связано с активацией ферментных систем, отвечающих за метаболические процессы бактерий.

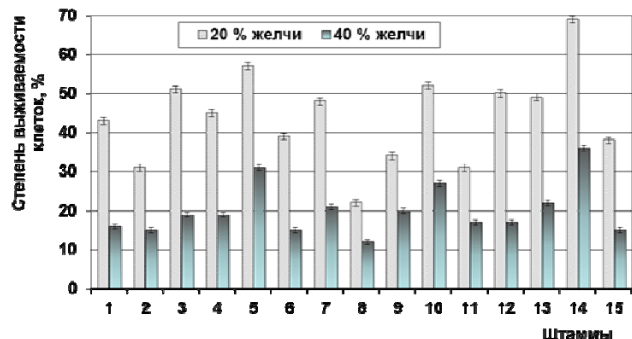


Рис. 2 – Выживаемость клеток молочнокислых бактерий в присутствии желчи

В присутствии желчи 20 и 40 % наблюдается снижение показателей роста и кислотообразования культур, так как клеточные мембраны, состоящие из липидов и жирных кислот, очень чувствительны к разрушению солями желчных кислот. Степень выживаемости при 20 % желчи составляет 20-69 %, а при концентрации 40 % - 12-36 % в зависимости от штамма. Следует отметить, что «дикие» штаммы молочнокислых бактерий проявляют большую устойчивость к желчи, в сравнении с производственными.

Исследования показали, что все исследуемые штаммы способны развиваться в присутствии 6,5 % NaCl, но степень их выживаемости различна (рис.3). Наименьшая резистентность наблюдается у штамма *Lmb. brevis* (Д) - 8 %, максимальную устойчивость проявляет *Lmb. casei* 5 (Д) – 47 %.

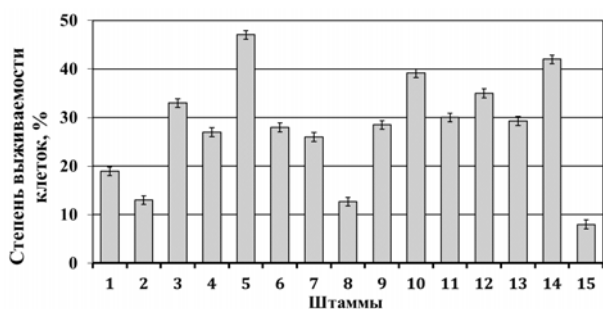


Рис. 3 – Влияние хлорида натрия на выживаемость клеток молочнокислых бактерий

На основании полученных данных можно выделить пять «диких» солеустойчивых штаммов: *Lmb. casei* 5 (Д), *Lmb. bavaricus* (Д), *Lmb. fermentum* 4 (Д), *Lmb. casei* 3 (Д) и *Lmb. plantarum* 2 (Д), имеющие более 30 % выживших клеток при культивировании в присутствии 6,5 % NaCl, все производственные штаммы имеют менее низкий процент выживаемости (13-30 %).

Установлено, что все культуры способны развиваться в среде с концентрацией фенола 0,4 % (рис. 4). Следует отметить, что наибольшей устойчивостью

к фенолу обладает штамм *Lmb. plantarum* 2 (Д) – 43 %, наименьшей - *Lmb. brevis* (Д) -15 %.

Наиболее перспективными по показателю устойчивости к фенолу являются четыре «диких» штамма молочнокислых бактерий (*Lmb. plantarum* 2 (Д), *Lmb. bavaricus* (Д), *Lmb. casei* 5 (Д), *Lmb. fermentum* 4 (Д)), степень выживаемости у которых в присутствии 0,4 % фенола превышает 30 %, что согласно данным научно-технической литературы характеризует штаммы микроорганизмов как высоко-толерантные к фенолу [8].

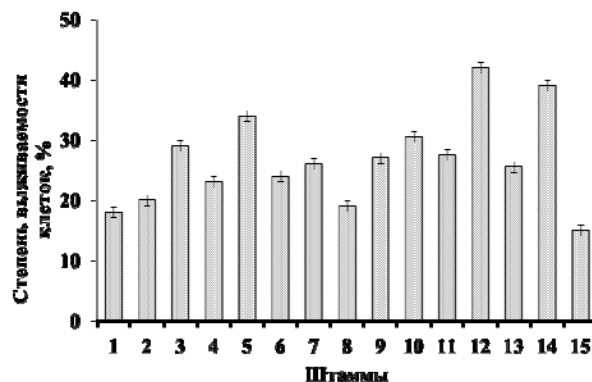


Рис. 4 – Устойчивость штаммов молочнокислых бактерий к фенолу

Анализируя результаты экспериментальных исследований, важно отметить, что штаммы молочнокислых бактерий *Lmb. bavaricus* (Д), *Lmb. casei* 5 (Д), *Lmb. plantarum* 2 (Д) и *Lmb. fermentum* 4 (Д) характеризуются, как более соле-, желче-, кислото- и фенолустойчивые штаммы в сравнении с производственными штаммами в соответствующих экспериментах. Полученные данные служат основой для прогнозирования способности данных штаммов молочнокислых бактерий к сохранению ими ферментативной активности по мере прохождения через желудочно-кишечный тракт и приживаемости в кишечнике, а также прогнозирования выживаемости штаммов в процессе хранения пищевых продуктов.

Таким образом, исследование степени устойчивости штаммов молочнокислых бактерий к неблагоприятным факторам окружающей среды, воспроизводящим «in vitro» некоторые условия желудочно-кишечного тракта, позволило выявить перспективные штаммы для применения их в качестве пробиотиков в производстве функциональных продуктов питания.

Литература

1. Рогожина, Т. Н. Пробиотические культуры и биологически активные белки молока. Новый функциональный комплексный компонент / Т. Н. Рогожина, В. И. Ганина, Г. С. Комолова // Молочная промышленность. - 2012. - № 5. - С.30-31.
2. Рябцева, С. А. Сохранение жизнеспособности заквасочной микрофлоры / С. А. Рябцева, М. А. Брачихина, В. И. Ганина // Молочная промышленность. - 2010. - N 1. - С. 22-23.
3. Хамагаева, И.С. Использование пробиотических культур для производства колбасных изделий / И.С. Хама-

- гаева, И.А. Ханхалаева, Л.И. Заиграева. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 204 с.
4. *Cagno, R.* Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lacto bacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system / R. Cagno, [et all] // *Int. Dairy J.* -2006. –V.16. –P. 119-130.
 5. *Новик, Г.И.* Биологическая активность микроорганизмов-пробионтов / Г.И. Новик, [и др.] // *Прикл. биохим. и микробиол.* - 2006 - Т.42, №2. - С. 187-194.
 6. *Шендеров, Б.А.* Пробиотики и функциональное питание/ Б.А.Шендеров - М.: Грантъ, 2001. - 288с.
 7. *Holzapfel, W.H.* Introduction to pre- and probiotics / W.H. Holzapfel, U. Shulinger // *Food Research International.* -2002. - V.35. – P. 125-129.
 8. *Park, H.S.* Selection of microorganisms for probiotic and their characterization / H.S. Park, S.H. Lee, T.B. Uhm // *Kor. J. Food Nutr.* - 1998. - V. 27. - P. 433-440.
 9. *Рожкова, Т.В.* Российский рынок заквасочных культур / Т.В. Рожкова // *Молочная промышленность.* - 2006. - № 3. - С.23-24.
 10. *Ананьева, Н.В.* Применение иммобилизованных форм пробиотических бактерий в производстве молочных продуктов / Н.В. Ананьева, [и др.]// *Молочная промышленность.* -2006. -№11. -С. 46-47.
 11. *Succi, M.* Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese / M.Succi, [et all] // *FEMS Microbiology Letters.* - 2005. - V. 244. - P.129-135.
 12. *Рогов, И.А.* Идентификация и отбор культур *Lactobacillus* для биотрансформации молочного сырья / И.А. Рогов [и др.] // *Биотехнология.* - 2003. - № 4. - С. 45-51.
 13. *Shah, N. P.* Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods / N. P. Shah // *J. Dairy Sci.* - 2000 - V.83 - P. 894-907.
 14. *Пономарев, В.Я.* Использование пищевых функциональных добавок в технологии мясных продуктов / Э.Ш. Юнусов, Э.Ш. Шайхиева, Г.О. Ежкова, В.П. Коростелева, О.А. Решетник // *Вестник Казанского технологического университета.* – 2011. - №22. – С. 93-98.
 15. *Charteris, W.P.* Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli / W.P. Charteris, [et all] // *J. Food Prot.* - 2001. - V. 64. - P. 2007-2014.

© С. В. Китаевская - канд. техн. наук, доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, kitaevskayas@mail.ru.