

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 пассивации 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 10⁶ 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 10⁷ 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 р. *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 элективные 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 кисломолочный. 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	Предельная, °Т
<i>Lmb. casei</i> 1 (Пр)	6	4,64	106 154	2,2	1010	
<i>Lmb. casei</i> 2 (Пр)	6	4,63	108 158	1,8	1010	
<i>Lmb. casei</i> 3 (Д)	7	4,70	108 154	1,0	1010	
<i>Lmb. casei</i> 4 (Д)	6	4,68	110 158	5,3	109	
<i>Lmb. casei</i> 5 (Д)	4	4,59	120 170	3,0	1010	
<i>Lmb. casei</i> 6 (Д)	6	4,71	110 156	1,8	1010	
<i>Lmb. fermentum</i> 1(Пр)	7	4,70	104 142	5,4	109	
<i>Lmb. fermentum</i> 2(Пр)	8	4,76	106 148	9,5	109	
<i>Lmb. fermentum</i> 3(Д)	6	4,75	100 138	3,6	109	
<i>Lmb. fermentum</i> 4(Д)	7	4,77	112 154	2,4	1010	
<i>Lmb. plantarum</i> 1(Пр)	6	4,71	104 176	7,7	109	
<i>Lmb. plantarum</i> 2 (Д)	6	4,70	102 178	1,5	109	
<i>Lbm. acidophilum</i> (Пр)	4	4,62	119 210	2,1	109	
<i>Lmb. bavaricus</i> (Д)	6	4,67	112 174	1,9	1010	
<i>Lmb. brevis</i> (Д)	14	5,00	76 122	4,9	108	

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 (109-1010 КОЕ/см³), а также уровень титруемой кислотности 100-120 °Т после 24 ч культивирования, что соответствует технологическим требованиям для производства многих видов кисломолочной 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 подтверждают 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 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 высокотолерантные 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.