

**Волкова Галина Сергеевна, зав. лаб., д.т.н.,
Куксова Елена Владимировна, с.н.с., к.т.н.,
Серба Елена Михайловна, зам. директора по научной работе д.б.н.,
чл.-корр. РАН**

ВНИИПБТ – филиал Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского центра питания,
биотехнологии и безопасности пищи (Россия, г.Москва)

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕЖШТАММОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Аннотация. В статье представлены данные по изучению биологических взаимодействий отдельных штаммов молочнокислых бактерий, используемых для повышения технологических свойств консорциумов. Подбор штаммов для совместного культивирования проводили по принципу биосовместимости с применением капельной методики. Установлены особенности роста штаммов молочнокислых бактерий, выделены группы штаммов, перспективных в отношении совместного культивирования с учетом кинетики роста каждого штамма. Предложены к использованию 4 двухштаммовых консорциума молочнокислых бактерий. Полученные данные могут быть использованы при создании новых пищевых продуктов с пробиотическими свойствами.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, биосовместимость, консорциум.

**Volkova Galina Sergeevna, laboratory chief, D.E.,
Kuksova Elena Vladimirovna, senior researcher, Ph.D.,
Serba Elena Mikhailovna, deputy director, D.E., member of RAS Academy
VNIIPBT – branch of the Federal State Budget Institute of the Federal Investigation
Centre of Nutrition, biotechnology and safety (Russia, Moscow)**

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL INTERSTRAINS AND GROWING PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA PRODUCTION STRAINS

Abstract. The data related to investigation of biological interactions of separate lactic acid bacteria used for increase of consortiums technological properties are presented. The selection of strains for combined cultivation was carried out by biocompatibility principle using the drop method. Lactic acid bacteria growth specifics were determined, the strains groups were selected perspective for combined cultivation considering kinetics of growth of each strain. 4 two-strains consortiums of lactic acid bacteria are proposed. The obtained data may be used for creation of food products with probiotic properties.

Key words: lactic acid bacteria, biocompatibility, consortium.

Введение. В настоящее время в мире продолжается поиск высокоактивных штаммов молочнокислых бактерий для создания молочнокислых продуктов, обладающих функциональными свойствами. Производство большинства пробиотических пищевых продуктов основано на применении бифидобактерий и молочнокислых бактерий, являющихся наиболее значимыми представителями желудочно-кишечного тракта человека [1].

Одной из основных причин низкой эффективности пробиотических продуктов питания является подбор видового состава микроорганизмов без учета их биосовместимости, что приводит к снижению количества живых клеток бактерий и утрате функциональных свойств.

В литературе описаны механизмы антагонизма у молочнокислых бактерий за счет продуктов метаболизма [2]. В результате бактерии конкурируют в консорциуме как за субстрат, так и с микрофлорой желудочно-кишечного тракта человека. Поэтому разработка новых биотехнологий молочнокислых продуктов должна проводиться с учетом актуальных данных о биосовместимости штаммов молочнокислых бактерий, входящих в их состав [3-7].

Для определения биосовместимости молочнокислых бактерий чаще всего используется капельная методика, которая является качественной и наиболее подходит для первичного тестирования. Для создания консорциумов наряду с биосовместимостью необходимо учитывать кинетику роста каждого штамма консорциума и длительность экспоненциальной фазы роста, на основе чего определяется время засева питательной среды при поэтапном внесении монокультур. Такой подход повышает биологические свойства консорциума молочнокислых бактерий и может использоваться при получении заквасок для кисломолочных продуктов, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, биологически активных добавок, предназначенных для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека.

Результаты опубликованных исследований [8-10] показали, что штаммы молочнокислых бактерий в составе консорциумов в зависимости от показателя уровня их биосовместимости достигают различного уровня накопления биомассы, т.е. различной численности бактериальных клеток при совместном культивировании.

Цель исследований – изучить биологические межштаммовые взаимодействия производственных штаммов молочнокислых бактерий и сопоставить их ростовые характеристики с перспективой создания новых эффективных консорциумов для пробиотических пищевых продуктов.

Материалы и методы исследования

Объектами исследований были 8 штаммов молочнокислых бактерий, являющихся промышленными продуцентами молочной кислоты из коллекции культур ВНИИПБТ: *Lactobacillus acidophilus* 1660, *L. delbrueckii* 1596, *L. plantarum* 578/26, *L. helveticus* 1147, *L. acidophilus* var. *coccoideus* M-94, *L. brevis* K-1, *L. casei* subsp. *rhamnosus* L-2, *L. delbrueckii* ВД.

Для оценки биосовместимости молочнокислых бактерий 24-часовую культуру наносили каплей на поверхность плотной среды MRS. Посев оставляли до полного впитывания капли. Затем, с отступом 1-2 мм от края первой капли, наносили каплю культуры тестируемого штамма, добиваясь затекания на пятно до половины диаметра. Чашки инкубировали в термостате при 37°C. Анализ результатов проводили через 24 и 48 ч после начала инкубации. В той части, где произошло наложение капель, можно ожидать синергизм или антагонистические отношения культур. Боковые области пятен каждой культуры служили контролем. Наличие антагонизма определяли визуально по наличию признаков подавления одной культуры другой. Культуры считали биосовместимыми в случае обнаружения полного слияния пятен. Если одна из культур в зоне перекрытия выходит наверх, подавляя рост второй культуры, такой вариант расценивали как сильный антагонизм.

Оценку антагонизма составленных ассоциаций штаммов проводили по методике Романович [2] по исчезновению окраски метиленовой сини культуральной жидкости консорциума. Реакция считалась положительной при обесцвечивании через 5-8 часов.

Результаты исследований

Исследование культуральных свойств изучаемых штаммов микроорганизмов на среде MRS показало, что все штаммы являются продуцентами молочной кислоты и на 48 часов роста активно накапливают биомассу с титром 10^8 - 10^9 КОЕ/см³. Использование методов молекулярно-генетической идентификации штаммов в данном исследовании не проводилось, но крайне необходимо для осуществления контроля в процессе производства, гарантирует идентичность данной культуры исходному штамму, позволяет контролировать чистоту используемой культуры, повышает безопасность производства.

Полученные результаты по изучению биосовместимости штаммов молочнокислых бактерий (таблица 1) показывают возможность совместного культивирования отдельных штаммов молочнокислых бактерий в подобранных парах, а также позволяет получать многокомпонентные пробиотические препараты (таблица 1, рисунок 1).

Для биосовместимых штаммов *Lactobacillus acidophilus* 1660 и *Lactobacillus plantarum* 578/26 проводилось изучение динамики роста на среде MRS, а также динамика роста смешанной культуры изучаемых штаммов (рисунок 1). Сопоставление ростовых характеристик позволило сделать вывод о том, что лаг-фаза этих культур практически совпадает и начинается в районе 4-4,5 часов. Поэтому смешанную культуру (консорциум) составляют объединенные для совместного культивирования 6-часовые культуры в соотношении 1:1.

Результаты исследований подтвердили повышение скорости роста консорциума по отношению к монокультуре, а также закономерное увеличение количества образуемой биомассы.

Проведено микроскопирование культуральных жидкостей через 24 часа роста консорциумов биосовместимых культур (рисунок 2). Отмечено отсутствие посторонней микрофлоры, высокая плотность популяции, равномерное распределение клеток в поле зрения.

Таблица 1 – Межштаммовые взаимодействия молочнокислых бактерий при их совместном культивировании

Объект исследования	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1660	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> 1596	<i>Lactobacillus plantarum</i> 578/26	<i>Lactobacillus helveticus</i> 1147	<i>L. acidophilus</i> var. <i>coccoideus</i> M-94	<i>Lactobacillus brevis</i> K-1	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> L-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ВД
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1660		+	+	+/-	+	-	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> 1596			+	+/-	-	+/-	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 578/26				+	+	-	-+	+/-
<i>Lactobacillus helveticus</i> 1147					+	+	+	+/-
<i>L. acidophilus</i> var. <i>coccoideus</i> M-94						-+	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i> K-1							+	+/-
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> L-2								-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ВД								

+ Штаммы биосовместимы, - Штаммы бионесовместимы, +/- Слабый антагонизм, -+ Сильный антагонизм

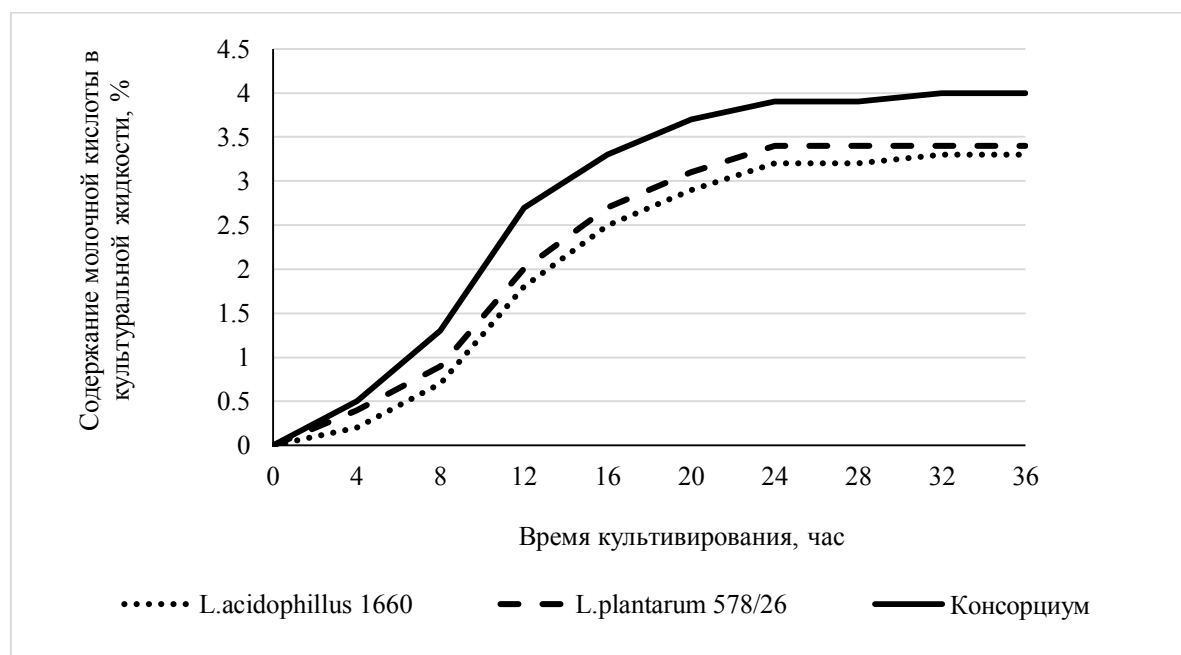


Рисунок 1 – Динамика роста культур *Lactobacillus acidophilus* 1660, *Lactobacillus plantarum* 578/26 и консорциума культур

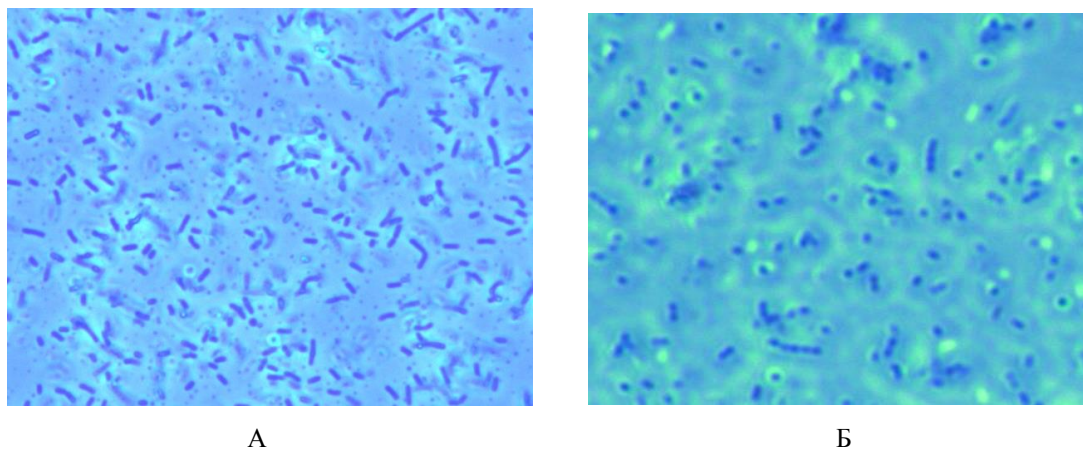


Рисунок 2 – Микроскопия культуральной жидкости через 24 часа культивирования на жидкой среде MRS консорциума *Lactobacillus plantarum* 578/26 и *Lactobacillus acidophilus* 1660 (А) и консорциума *L. acidophilus* var. *coccoideus* M-94 и *Lactobacillus plantarum* 578/26 (Б)

Выборочные двухштаммовые консорциумы штаммов были проверены на антагонизм по методике Романович по изменению окраски метиленовой сини. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты изучения антагонизма консорциумов бактерий

Наименование штамма	Фильтрат культуральной жидкости
<i>L. acidophilus</i> 1660 / <i>L. plantarum</i> 578/26	реакция отрицательная
<i>L. acidophilus</i> 1660 / <i>L. brevis</i> K-1	реакция положительная
<i>L. rhamnosus</i> L-2 / <i>L. helveticus</i> 1147	реакция отрицательная
<i>L. brevis</i> K-1 / <i>L. plantarum</i> 578/26	реакция положительная
<i>L. acidophilus</i> var. <i>coccoideus</i> M-94 / <i>L. rhamnosus</i> L-2	реакция положительная
<i>L. brevis</i> K-1 / <i>L. helveticus</i> 1147	реакция отрицательная
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> L-2 / <i>L. brevis</i> K-1	реакция отрицательная

Комбинации штаммов, дающие отрицательную реакцию с метиленовой синью (4 пары), могут быть рекомендованы для составления комбинированных заквасок. Полученные экспериментальные данные по биосовместимости производственных штаммов молочнокислых бактерий могут быть использованы при создании новых пищевых продуктов с пробиотическими свойствами.

Выводы. Результаты исследований подтвердили, что для повышения биологических и технологических свойств консорциумов молочнокислых бактерий необходимо учитывать биологическую совместимость входящих в консорциум штаммов и их ростовые свойства. На основе проведенных экспериментов предложены к использованию 4 двухштаммовых консорциума молочнокислых бактерий, которые могут найти применение в технологиях новых пищевых продуктов с пробиотическими свойствами.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019 - 2021 годы (тема № 0529-2019-0066)

Список литературы

1. Пономарева Е.И., Алехина Н.Н., Журавлев А.А. Исследование изменения кислотности в закваске спонтанного брожения // Вестник ВГУИТ. 2013. № 3. С. 82-84.
2. Глушанова Н.А., Блинов А.И. Биосовместимость пробиотических и резидентных лактобацилл // Тезисы VII Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург - Гастро-2005». 2005. №1. С. 31-36.
3. Глушанова Н.А., Вербицкая Н.Б., Петров Л.Н., Блинов А.И., Шендеров Б.А. Исследование ауто-, изо- и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2005. № 6 (44). С. 138-142.
4. Чижаева А.В., Тулемисова Ж.К., Дудикова Г.Н., Жубанова А.А. Физиолого-биохимические свойства новых штаммов молочнокислых бактерий перспективных для создания пробиотических препаратов // Биотехнология. Теория и практика. 2002. № 2. С.12-18.
5. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопросы питания. 1999. № 2. С. 32-40.
6. Иркитова А.Н. Сравнительная оценка штаммов ацидофильной палочки для использования в составе пробиотических продуктов // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. №4/1 (38). С. 30-31.
7. Rolfe R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health // J. Nutrition. 2000. V. 130. (2S Suppl). P. 396-402.
8. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2005. № 2. С. 56-61.
9. Адманова Г.Б., Дудикова Г.Н., Макажанова Х.Х., Рахметова Н.Б. Антагонистическая активность и чувствительность к антибиотикам молочнокислых бактерий, выделенных из молочных продуктов различных регионов Казахстана // Биотехнология. Теория и практика. 2004. № 4. С. 123-126.
10. Карцев В. В., Белова Л. В., Иванов В. П. Санитарная микробиология пищевых продуктов. СПб: СПбГМА им. Мечникова, 2000. 312 с.