

Н.С. Романович, Е.Н. Бирюк, к.с.-х.н., Т.А. Савельева, к.в.н., доцент,  
Н.К. Жабанос, к.т.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТАЦИИ УГЛЕВОДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ОРГАНИЗМА ПЧЕЛ И ПЧЕЛОПРОДУКТОВ

N. Ramanovich, A. Biruk, T. Savelieva, N. Zhabanos, N. Furik  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

## CHARACTERISTICS OF THE FERMENTATION OF CARBOHYDRATES AND THEIR DERIVATIVES BY LACTOBACILLA ISOLATED FROM BEE AND BEE PRODUCTS

e-mail: romanovich28@tut.by, biohimbel@rambler.ru,  
t.savelyeva@tut.by, nzhabanos@tut.by, furik\_nn@tut.by

С использованием стрип-тестов API 50 CH изучена ферментация углеводов и их производных различными видами лактобацилл, выделенными из организма пчел и пчелопродуктов. Все исследованные культуры, выделенные из пчел и пчелопродуктов, способны усваивать фруктозу, что свидетельствует о перспективе их использования в составе пробиотических препаратов. Штаммы L47 (*Lactobacillus kimbladii*) и L49 (*Lactobacillus apis*) формируют биохимические профили, схожие с биохимическим профилем типового штамма *Lb. acidophilus*. Культуры L41, L42 (*Lactobacillus paracasei*) и L43 (*Lactobacillus rhamnosus*), ферментирующие пентозы: D-рибозу, D-ксилозу, D-лихозу, являются перспективными для использования в составе биоконсервантов для силосования.

Using API 50 CH strip tests, the fermentation of carbohydrates and their derivatives by various species of lactobacilli, isolated from the body of bees and bee products, was studied. All studied cultures, isolated from bees and bee products, are able to assimilate fructose, which indicates the prospect of their use as part of probiotic preparations. Strains L47 (*Lactobacillus kimbladii*) and L49 (*Lactobacillus apis*) form biochemical profiles, similar to those of the typical strain *Lb. acidophilus*. Cultures L41, L42 (*Lactobacillus paracasei*) and L43 (*Lactobacillus rhamnosus*), fermenting pentoses: D-ribose, D-xylose, D-lyxose, are promising for use as part of biopreservatives for ensiling.

**Ключевые слова:** пчелы; пчелопродукты; лактобациллы; углеводы; ферментация.

**Key words:** Bees; bee products; lactobacilli; carbohydrates; fermentation.

**Введение.** В настоящее время в развитии микробных биотехнологий особое внимание уделяется выделению новых, перспективных штаммов молочнокислых и бифидобактерий. Одним из главных свойств, которым должны обладать новые штаммы, является высокая антагонистическая активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Известно, что многие штаммы бифидобактерий и молочнокислых бактерий являются антагонистами сальмонелл, а также ингибируют рост бактерий родов *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Gardnerella* и др.[1].

В научной литературе приводятся данные о молочнокислых пробиотических бактериях, содержащихся в медовом зобике пчелы (*Lb. plantarum*, *Lb.pentosus*, *Lb. fermentum*, *Lb. kunkeei*, *Lb. buchneri* и *Lb. acidophilus*) и в свежем меде [2, 3]. Из перги были выделены бактерии вида *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus panisapium* sp., *Lactobacillus pollinis* [4–6]. Из кишечника пчел также были выделены бактерии *Lactobacillus reuteri*, которые синтезируют несколько совершенно уникальных веществ: реутерин, способный ингибировать рост *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*,

*Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *H. pylori*, а также ряда грибов и других микроорганизмов [7] и реутерициклин, который обладает антибактериальной активностью, в связи с чем его относят к группе антибиотикоподобных веществ [8].

Микрофлора кишечника медоносных пчел передается социально и через поверхности ульев, но некоторые бактерии также обнаруживаются на цветках, и поэтому могут передаваться между пчелами косвенно, через цветы. Филогенетический анализ почти полноразмерных последовательностей гена 16S рРНК показал, что бактерии рода *Lactobacillus*, доминирующие в микробиотах, ассоциированных с растениями, являются монофилетическими (т.е. происходящими от общего предка), для них предложено название *Lactobacillus micheneri* sp. [9]. Микробиота кишечника медоносных пчел использует широкий спектр субстратов, полученных из пыльцы, включая флавоноиды и компоненты внешней стенки пыльцы, при этом бактерии рода *Lactobacillus*, и, в частности, *Lactobacillus kunkeei*, отвечают за наибольшую долю метаболизма [10].

Таким образом, микробиота пчел и пчелопродукты являются перспективными источниками выделения молочнокислых и бифидобактерий, с целью их дальнейшего использования в пищевой промышленности и для создания пробиотических препаратов.

**Материалы и методы исследований.** Объектами исследований являлись 11 штаммов лактобацилл, выделенных из организма пчел и пчелопродуктов.

Определение способности ферментировать углеводы и их производные проводили с использованием стрип-тестов. В работе использованы стрип-тесты API 50 CH (BioMerieux, Франция) в сочетании со средой API 50 CHL (BioMerieux, Франция), которые позволяют изучать метаболизм углеводов у микроорганизмов.

Для изучения ферментации углеводов и их производных 0,5 см<sup>3</sup> культуры вносили в пробирку с 10 см<sup>3</sup> жидкой MRS-среды, инкубировали в термостате в анаэробных условиях при температуре (37±1)°С в течение (16±2) ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 6 тыс. об/мин и ресуспендировали в 1 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора. После определения оптической плотности определенное количество полученной суспензии вносили в CHL-среду, чтобы оптическая плотность полученного инокулята составила (0,25±0,05). Подготовленную суспензию, смешанную со средой, вносили в лунки стрип-теста, после чего каждую лунку заливали минеральным маслом. Стрип-тесты инкубировали при температуре (37±1)°С в течение 48 ч, учет результатов проводили через 24 и 48 часов с помощью программного обеспечения ATB-plus.

**Результаты и их обсуждение.** Изучены свойства 11 штаммов лактобацилл, выделенных из организма пчел и пчелопродуктов. С помощью молекулярно-генетических методов (секвенирование последовательности гена 16S рРНК) установлено, что 2 штамма (L41 и L42) относятся к виду *Lactobacillus paracasei*, 1 штамм (L43) – к виду *Lactobacillus rhamnosus*, 2 штамма (L44 и L45) – к виду *Lactobacillus kunkeei*, 2 штамма (L46 и L47) – к виду *Lactobacillus kimbladii*, 1 штамм (L48) – к виду *Lactobacillus mellis*, 1 штамм (L49) – к виду *Lactobacillus apis*, 2 штамма (L50 и L51) – к виду *Lactobacillus helsingborgensis*. Сравнительная характеристика ферментируемых субстратов штаммами, выделенными из пчел и пчелопродуктов, представлена на рисунке 1.

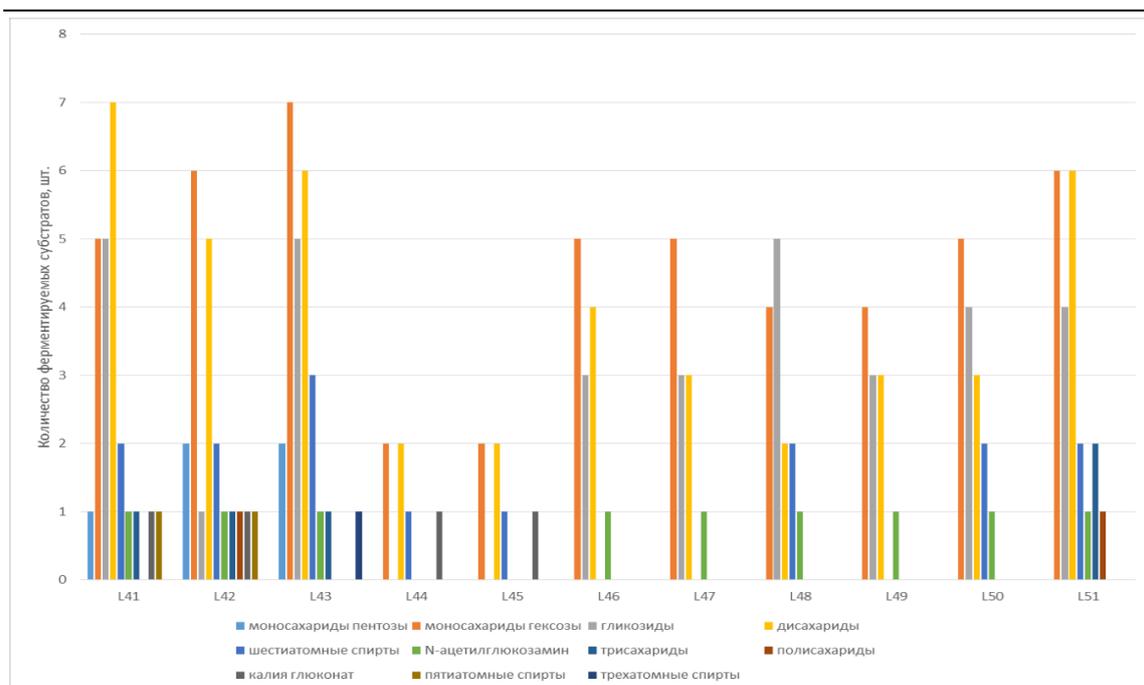


Рисунок 1 – Сравнительная характеристика ферментируемых субстратов штаммами, выделенными из пчел и пчелопродуктов  
 Источник данных: собственная разработка.

При анализе ферментации углеводов и их производных с использованием стрип-тестов API 50 CH культурами *Lactobacillus paracasei* установлено, что штамм L41 ферментирует 24 исследуемых углевода и их производных. При этом 29,2% ферментируемых субстратов представлены дисахаридами (D-целлобиоза, D-мальтоза, D-лактоза, D-сахароза, D-трегалоза, гентиобиоза, D-тураноза), 20,8% – моносахаридами гексозами (D-галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, D-тагатоza), 20,8% – гликозидами (метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, амигдалин, арбутин, эскулин, салицин), 4,2% – моносахаридом пентозой (D-рибоза). Штамм L42 ферментирует 21 исследуемый углевод и их производные. При этом 28,6% ферментируемых субстратов представлены моносахаридами гексозами (D-галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, L-сорбоза, D-тагатоza), 23,8% – дисахаридами (D-мальтоза, D-лактоза, D-сахароза, D-трегалоза, D-тураноза), 9,5% – моносахаридами пентозами (D-рибоза, D-ликсоза).

Таким образом, оба штамма *Lactobacillus paracasei* наиболее активно ферментируют дисахариды, моносахариды гексозы и могут ферментировать моносахариды пентозы. Штамм L41 также активно ферментируют гликозиды, а для штамма L42 ферментация гликозидов не характерна (за исключением эскулина). Штамм L42 может ферментировать полисахарид инулин. У штамма L41 способность к ферментации изученных полисахаридов отсутствует. Также оба исследованных штамма в качестве источника углерода и энергии могут использовать трисахарид (D-мелицитозу), шестиатомные спирты (D-маннит, D-сорбит), производное аминсахара глюкозамина (N-ацетил-глюкозамин), пятиатомный спирт (L-арабит), калия глюконат.

В Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов поддерживаются штаммы *Lactobacillus paracasei*, выделенные из различных природных источников: из фекалий здорового ребенка (штамм 2639 ML-O), из глаз и жабр карпа (штамм 2799 ML-O), из силоса (штамм 2880 ML-OF). При анализе ферментации углеводов штаммами *Lactobacillus paracasei*, выделенных из различных источников, установлено, что все штаммы ферментируют широкий спектр

исследованных субстратов: 17 субстратов ферментирует штамм 2880 ML-OF (выделен из силоса), 21 субстрат – штамм L42 (выделен из подмора пчел), 23 субстрата – штамм 2799 ML-O (выделен из глаз и жабр карпа), 24 субстрата – штамм L41 (выделен из подмора пчел), 25 субстратов – штамм 2639 ML-O (выделен из фекалий здорового ребенка). Таким образом, штаммы *Lactobacillus paracasei*, выделенные из подмора пчел, способны использовать в качестве углерода и энергии такой же широкий спектр субстратов, как и штаммы, выделенные из других источников. Следует отметить, что все исследованные штаммы *Lactobacillus paracasei* наиболее активно ферментируют дисахариды и моносахариды гексозы, а также способны ферментировать моносахариды пентозы. Интересной особенностью штамма L42, выделенного из подмора пчел, является отсутствие способности к ферментации гликозидов (за исключением эскулина).

Установлено, что штамм *Lactobacillus rhamnosus* L43 ферментирует 26 исследуемых углеводов и их производных. При этом 26,9% ферментируемых субстратов представлены моносахаридами гексозами (D-галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, L-сорбоза, L-рамноза, D-тагатоza), 23,1% ферментируемых субстратов представлены дисахаридами (D-целлобиоза, D-мальтоза, D-лактоза, D-трегалоза, гентиобиоза, D-тураноза), 19,2% – гликозидами (метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, амигдалин, арбутин, эскулин, салицин). Таким образом, определено, что штамм L43 наиболее активно ферментирует моносахариды гексозы, дисахариды и гликозиды. Также штамм L43 в качестве источника углерода и энергии может использовать шестиатомные спирты (инозит, D-маннит, D-сорбит), трехатомные спирты (глицерин), моносахариды пентозы (D-рибозу, D-ксилозу), производное аминокислоты глюкозамина (N-ацетил-глюкозамин), трисахарид (D-мелицитозу).

В Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов поддерживаются штаммы *Lactobacillus rhamnosus*, выделенные из различных природных источников: из фекалий здорового ребенка (штаммы 2641 TL-O, 2642 TL-O), из фекалий здорового взрослого (штамм 2643 TL-O), из силоса (штамм 2879 TL-OF). Установлено, что все коллекционные штаммы *Lactobacillus rhamnosus* ферментируют широкий спектр исследованных субстратов: 24 субстрата ферментирует штамм 2641 TL-O, (выделен из фекалий здорового ребенка), 25 субстратов – штамм 2643 TL-O, (выделен из фекалий здорового взрослого), 26 субстратов – штаммы 2642 TL-O (выделен из фекалий здорового ребенка), 2879 TL-OF, (выделен из силоса), L43 (выделен из перги с прополисом). В отличие от остальных штаммов *Lactobacillus rhamnosus* особенностью штамма L43, выделенного из пчелопродукта (перги с прополисом), является его способность использовать в качестве источника углерода и энергии трехатомный спирт глицерин, а также D-ксилозу – «древесный сахар», моносахарид из группы пентоз, которая входит в состав растительных слизей, гумми, является одним из мономеров полисахарида клеточных стенок – гемицеллюлозы ксилана.

Оба штамма *Lactobacillus kunkeei* L44 и L45 имеют идентичный биохимический профиль и ферментируют очень небольшое количество углеводов и их производных. Культуры могут использовать в качестве источника углерода и энергии только D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннит, D-сахарозу, D-трегалозу и калия глюконат. Таким образом, определено, что штаммы L46 и L47 обладают способностью к ферментации ограниченного количества моносахаридов гексоз и дисахаридов, а также шестиатомного спирта и калиевой соли глюконовой кислоты. Оба исследованных штамма не обладают способностью к ферментации моносахаридов пентоз.

Культуры *Lactobacillus kimbladii* L46 и L47 также ферментируют небольшое количество углеводов и их производных (13 субстратов). При этом 38,5% субстратов, ферментируемых штаммом L46, представлены моносахаридами гексозами (D-галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, D-тагатоza), 30,8% – дисахаридами

(D-целлобиоза, D-лактоза, D-трегалоза, D-тураноза), 23,1% – гликозидами (арбутин, эскулин, салицин). Штамм L47 ферментирует 12 субстратов. Из них 41,7% ферментируемых субстратов представлены моносахаридами гексозами (D-галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, D-тагатоza), 25,0% – дисахаридами (D-целлобиоза, D-сахароза, D-трегалоза), 25,0% – гликозидами (арбутин, эскулин, салицин).

Установлено, что культуры L46 и L47 обладают достаточно схожим биохимическим профилем. Так, оба штамма наиболее активно ферментируют идентичные моносахариды гексозы и гликозиды, а также могут ферментировать производное аминсахара глюкозамина (N-ацетил-глюкозамин) и не обладают способностью к ферментации моносахаридов пентоз и спиртов. При этом различия в биохимическом профиле у данных штаммов наблюдаются только в процессе ферментации дисахаридов. Так, штамм L46 может использовать в качестве источника углерода и энергии дисахарид лактозу и туранозу и не ферментирует дисахарид сахарозу. Штамм L47 обладает обратными свойствами – не ферментирует лактозу и туранозу и ферментирует сахарозу. Именно эти особенности формируют для штамма L47 биохимический профиль, максимально приближенный к биохимическому профилю типового штамма *Lactobacillus acidophilus* из базы данных ATB-plus.

Для культуры *Lactobacillus mellis* L48 установлено, что штамм ферментирует 14 углеводов и их производных. При этом 35,7% ферментируемых субстратов представлены гликозидами (метил- $\alpha$ D-глюкопиранозид, амигдалин, арбутин, эскулин, салицин), 28,6% – моносахаридами гексозами (D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, L-сорбоза). Также штамм L48 может ферментировать шестиатомные спирты (D-маннит, D-сорбит), дисахариды (D-целлобиозу, D-сахарозу), производное аминсахара глюкозамина (N-ацетил-глюкозамин). Данный штамм не обладает способностью к ферментации моносахаридов пентоз. Таким образом, интересной особенностью для штамма *Lactobacillus mellis* L48 является то, что он в качестве источников углерода и энергии наиболее активно использует различные гликозиды.

При анализе ферментации углеводов и их производных с использованием стрип-тестов API 50 CH культурой *Lactobacillus apis* L49 установлено, что штамм L49 ферментирует небольшое количество углеводов и их производных (11 субстратов). При этом 36,4% ферментируемых субстратов представлены моносахаридами гексозами (D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, D-тагатоza), 27,3% – гликозидами (амигдалин, эскулин, салицин), 27,3% – дисахаридами (D-целлобиоза, D-сахароза, D-трегалоза). Также штамм L49 может ферментировать N-ацетил-глюкозамин.

Таким образом, культура *Lactobacillus apis* L49 ферментирует моносахариды гексозы, гликозиды и дисахариды. Следует отметить, что штамм L49 формирует биохимический профиль, схожий с биохимическим профилем типового штамма *Lb. acidophilus* из базы данных ATB-plus.

Для культур *Lactobacillus helsingborgensis* L50 и L51 установлено, что штамм L51 ферментирует 22 исследуемых углевода и их производных. При этом 27,3% ферментируемых субстратов представлены моносахаридами гексозами (D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, L-сорбоза, L-рамноза, D-тагатоza), 27,3% – дисахаридами (D-целлобиоза, D- мальтоза, D- лактоза, D-мелибиоза, D-сахароза, D-трегалоза), 18,2% – гликозидами (амигдалин, арбутин, эскулин, салицин), 9,1% –шестиатомными спиртами (дульцитол, D-сорбит), 9,1% – трисахаридами (D-мелицитоза, D-раффиноза), 4,5% – производным аминсахара глюкозамина (N-ацетил-глюкозамин), 4,5% – полисахаридом (инулин). Штамм L50 ферментирует 15 исследуемых углеводов и их производных. Из них 33,3% ферментируемых субстратов представлены моносахаридами гексозами (D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, L-сорбоза, D-тагатоza), 26,7% – гликозидами (амигдалин, арбутин, эскулин, салицин), 20,0% – дисахаридами (D-целлобиоза, D-трегалоза,

гентиобиоза), 13,3% – шестиатомными спиртами (дульцитол, D-сорбит), 6,7% – производным аминсахара глюкозамина (N-ацетил-глюкозамин).

Таким образом, штаммы L50 и L51 обладают достаточно схожим биохимическим профилем: оба штамма наиболее активно ферментируют моносахариды гексозы, дисахариды и гликозиды. При этом штамм L51 может использовать в качестве источника углерода и энергии более широкий спектр моносахаридов гексоз и дисахаридов, а также ферментирует трисахариды D-мелицитозу и D-раффинозу и полисахарид инулин.

**Заключение.** С использованием стрип-тестов API 50 CH изучена ферментация различных углеводов и их производных у 11 штаммов лактобацилл, выделенных из организма пчел и пчелопродуктов. Установлено, что штаммы L41 (*Lb. paracasei*), L42 (*Lb. paracasei*), L43 (*Lb. rhamnosus*), L51 (*Lb. helsingborgensis*) способны ферментировать максимальное количество (20 и более) из изученных субстратов. Штаммы L46 (*Lb. kimbladii*), L47 (*Lb. kimbladii*), L48 (*Lb. mellis*), L49 (*Lb. apis*), L50 (*Lb. helsingborgensis*) могут использовать в качестве источника углерода и энергии ограниченное количество субстратов (от 11 до 19 субстратов). Наименьшее количество углеводов и их производных ферментируют штаммы *Lactobacillus kunkeei* L44 и L45 (6 субстратов).

Интересной особенностью 11 лактобактерий, выделенных из пчел и пчелопродуктов, является их способность усваивать фруктозу, которая является одной из причин синдрома раздраженного кишечника, это свидетельствует о перспективе использования выделенных культур в составе пробиотических препаратов.

Большой интерес из изученной группы лактобактерий представляют штаммы L47 (*Lactobacillus kimbladii*) и L49 (*Lactobacillus apis*), поскольку они формируют биохимические профили, схожие с биохимическим профилем типового штамма *Lb. acidophilus*, и в дальнейшем будут изучена их антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам для оценки возможности использования их в качестве пробиотиков и перспективных биоконсервантов.

Способность бактерий утилизировать различные сахара также очень важна для культур, используемых в составе биоконсервантов: С<sub>6</sub>-сахара (гексозы) могут утилизировать и гомо- и гетероферментативные лактобактерии, тогда как пентозы могут ферментировать только некоторые гетероферментативные бактерии. Следовательно, культуры L41, L42 (*Lactobacillus paracasei*) и L43 (*Lactobacillus rhamnosus*), ферментирующие пентозы: D-рибозу, D-ксилозу, D-ликсозу, являются перспективными для использования в составе биоконсервантов для силосования.

Таким образом, все исследованные лактобациллы могут использоваться для производства биотехнологической продукции в сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

### Список использованных источников

1. Емцев В. Т. Микробиология: учебник для бакалавров / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин // М. : Юрайт, 2012. – 445 с.

2. Servin, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens / A. L. Servin // FEMS Microbiol Rev. – 2004. – Vol. 28, № 4. – P. 405-440.

3. Olofsson T. C. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities / T. C.

1. Emcev V. T. Mikrobiologija: uchebnik dlja bakalavrov [Microbiology: textbook for bachelors] / V. T. Emcev, E. N. Mishustin // M. : Jurajt, 2012. – 445 s.

- Olofsson [et al.] // *Int Wound J.* – 2016. – Vol. 13, № 5. – P. 668-679.
4. Tajabadi N. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee / N. Tajabadi [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* 2013. – Vol. 44, № 3. – P. 717-722.
5. Anderson K. E. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*) / K. E. Anderson [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. 83125.
6. Wang C. *Lactobacillus panisapium* sp. nov., from honeybee *Apis cerana* bee bread / C. Wang [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2018. – Vol. 68, № 3. – P. 703-708.
7. Egorova A. I. Preservative microflora in stored pollen / A. I. Egorova // *Veterinariya.* – 1971. – № 8. – P. 40-41.
8. Афонюшкин, В. Н. Механизмы биологической активности системы *Lactobacillus reuteri* – реутерин / В. Н. Афонюшкин, М.Л. Филипенко, А.Н. Ширшова, О. Г. Маслов // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки.* – 2013. – № 4. – С. 70-75.
8. Afonjushkin, V. N. Mehanizmy biologicheskoy aktivnosti sistemy *Lactobacillus reuteri* – reuterin [Mechanisms of biological activity of the *Lactobacillus reuteri* system – reuterin] / V. N. Afonjushkin, M.L. Filipenko, A.N. Shirshova, O. G. Maslov // *Sibirskij vestnik sel'skhozjajstvennoj nauki.* – 2013. – № 4. – S. 70-75.
9. Hoeltzel A. ChemInform abstract: the first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin (I), a new tetramic acid / A. Hoeltzel [et al.] // *ChemInform.* – 2000. – Vol. 31, № 45. – P. 2766-2768.
10. McFrederick Q. S. Flowers and wild megachilid bees share microbes / Q. S. McFrederick [et al.] // *Microb Ecol.* – 2017. – Vol. 73, № 1. – P. 188-200.
11. Kešnerová L. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut / L. Kešnerová [et al.] // *PLoS Biol.* – 2017. – Vol. 15, № 12. – P. 2003467.